

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|   |  |   |   |
|---|--|---|---|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b><br><b>A61K 33/04, 31/495, 31/40 // (A61K 33/04, 31:40) (A61K 33/04, 31:495)</b>  |  | <b>A1</b>   | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/64018</b><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Dezember 1999 (16.12.99)</b> |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/03771<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 31. Mai 1999 (31.05.99)<br><br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>198 25 746.5      9. Juni 1998 (09.06.98)      DE<br><br><b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BIOSYN<br>ARZNEIMITTEL GMBH [DE/DE]; Schorndorfer Strasse<br>32, D-70734 Fellbach (DE).<br><br><b>(72) Erfinder; und</b><br><b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> STIEFEL, Thomas [DE/DE];<br>Steinkopfstrasse 22, D-70184 Stuttgart (DE). RÖHRER,<br>Helmut [DE/DE]; Isenberg 19, D-79206 Breisach (DE).<br><br><b>(74) Anwalt:</b> GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR &<br>SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538<br>München (DE).   |  | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, JP, US, europäisches Patent (AT,<br>BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,<br>MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.<br/>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen<br/>Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen<br/>eintreffen.</i> |   |
| <b>(54) Title:</b> COMBINATION OF COMPOUNDS CONTAINING SELENIUM AND CYTOSTATIC AGENTS<br><b>(54) Bezeichnung:</b> KOMBINATION VON SELEN-HALTIGEN VERBINDUNGEN MIT ZYTOSTATIKA<br><b>(57) Abstract</b><br><p>The invention relates to the use of selenium and/or a derivative thereof in conjunction with one or more cytostatic agents. The aim of the invention is to intensify the effect of anti-tumour agents and to provide these agents in a suitable form of administration. To this end, selenium and/or at least one selenium compound is used to intensify the effect of one or more cytostatic agents. This combination results in a synergistic, i.e., superadditive reinforcement of the effect. The invention also relates to a kit containing selenium and/or at least one selenium compound and one or more cytostatic agents, in the form of a combination preparation for use in cytostatic therapy. The invention can be used effectively against various types of tumour, however especially against large and small-cell bronchial carcinomas, glandular carcinomas, pancreatic carcinomas, prostate carcinomas and hypernephromas.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b><br><p>Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Selen und/oder einem Derivat davon in Kombination mit einem oder mehreren Zytostatika. Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine Möglichkeit anzugeben, bei antitumoralen Wirkstoffen eine Wirkungssteigerung zu erzielen, sowie diese Wirkstoffe in geeigneter Darreichungsform bereitzustellen. Diese Aufgabe wird durch die Verwendung von Selen und/oder mindestens einer Selenverbindung zur Wirkungssteigerung eines oder mehrerer Zytostatika gelöst. Diese Kombination führt zu einer synergistischen, d.h. überadditiven Wirkungsverstärkung. Weiterhin wird in der vorliegenden Erfindung ein Kit bereitgestellt, der Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung und ein oder mehrere Zytostatika als Kombinationspräparat für die zytostatische Therapie enthält. Die vorliegende Erfindung kann wirksam gegen verschiedene Tumorzellarten eingesetzt werden, im besonderen jedoch gegen groß- und kleinzellige Bronchialkarzinome, Adenokarzinome, Pankreaskarzinome, Prostatakarzinome und Hypernephrome.</p> |  |   |   |

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                   |    |   |    |                                |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                           | LS | Lesotho   | SI | Slowenien                      |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                          | LT | Litauen   | SK | Slowakei                       |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                        | LU | Luxemburg                                       | SN | Senegal                        |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                             | LV | Lettland  | SZ | Swasiland                      |
| AZ | Aserbaidshon                 | GB | Vereinigtes Königreich            | MC | Monaco  | TD | Tschad                         |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                          | MD | Republik Moldau                                 | TG | Togo                           |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                             | MG | Madagaskar                                      | TJ | Tadschikistan                  |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                            | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                   |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                      |    |   | TR | Türkei                         |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                            | ML | Mali  | TT | Trinidad und Tobago            |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                            | MN | Mongolei  | UA | Ukraine                        |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                            | MR | Mauretanien                                     | UG | Uganda                         |
| BY | Belarus                      | IS | Island                            | MW | Malawi  | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                           | MX | Mexiko  |    |                                |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                             | NE | Niger   | UZ | Usbekistan                     |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                             | NL | Niederlande                                     | VN | Vietnam                        |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                       | NO | Norwegen  | YU | Jugoslawien                    |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | NZ | Neuseeland                                      | ZW | Zimbabwe                       |
| CM | Kamerun                      |    |                                   | PL | Polen   |    |                                |
| CN | China                        | KR | Republik Korea                    | PT | Portugal  |    |                                |
| CU | Kuba                         | KZ | Kasachstan                        | RO | Rumänien  |    |                                |
| CZ | Tschechische Republik        | LC | St. Lucia                         | RU | Russische Föderation                            |    |                                |
| DE | Deutschland                  | LI | Liechtenstein                     | SD | Sudan   |    |                                |
| DK | Dänemark                     | LK | Sri Lanka                         | SE | Schweden  |    |                                |
| EE | Estland                      | LR | Liberia                           | SG | Singapur  |    |                                |

### **Kombination von Selen-haltigen Verbindungen mit Zytostatika**

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Selen und/oder einem Derivat davon in Kombination mit einem Zytostatikum oder einer Mischung von Zytostatika.

Das chemische Element Selen ist ein für Menschen und Tiere essentielles Spurenelement, das vor allem oxidative Prozesse sowie den Thyroxinmetabolismus beeinflusst. Beim Menschen konnte nachgewiesen werden, daß das Enzym Glutathionperoxidase und das im Plasma auftretende Selenoprotein P jeweils Selen in Form der Aminosäure Selenocystein enthalten. Die Selen-haltige Glutathionperoxidase ist Bestandteil des antioxidativen Schutzsystems der Säugetierzelle. In Gegenwart ausreichender Mengen an Substrat, d.h. reduziertem Glutathion, konvertiert die Glutathionperoxidase eine Vielzahl verschiedener Hydroperoxide zu entsprechenden Alkoholen. Es konnte gezeigt werden, daß die Integrität zellulärer und subzellulärer Membranen entscheidend von der Intaktheit des Glutathionperoxidase-Systems abhängt. Selen als Bestandteil der Glutathionperoxidase kann die Lipidperoxidationsrate und daraus resultierende Membranschäden senken.

In Tieren wurde kürzlich die Typ-I-Iodthyronin-5'-Deiodase als Selen-haltiges Enzym charakterisiert. Die Iodthyronin-Deiodase wandelt auch beim Menschen in der Schilddrüse, Leber und Niere Thyroxin ( $T_4$ ) in Triiodthyronin ( $T_3$ ), das aktive Schilddrüsenhormon, um. Bei Selenmangel, z.B. bei Phenylketonurie und zystischer Fibrose, konnten erhöhte  $T_4$ -Werte bei gleichzeitig reduziertem  $T_3$ -Spiegel nachgewiesen werden. Durch die Gabe von Natriumselenit ( $Na_2SeO_3$ ) normalisiert sich der Schilddrüsenstoffwechsel wieder.

Als weiteres selenabhängiges Enzym wurde kürzlich eine humane Thioredoxinreduktase aus Lungenzellen beschrieben, die Selen als Ko-Faktor enthält (Tamura und Stadtman, 1996, Biochemistry, Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 1006-1011). Das Enzym konnte bislang aus T-Zellen, Lungengewebe und Plazenta isoliert werden (Gladyshev et al., 1996, Biochemistry, Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 6146-6151). Das selenabhängige Enzym Thioredoxinreduktase reduziert Thioredoxin. Thioredoxin wird bei einer Reihe von Tumoren überexprimiert, und einige experimentelle Studien haben gezeigt, daß Thioredoxin zum

Wachstum und zur malignen Transformation einiger humaner Krebszellen beiträgt. Das Enzym Thioredoxinreduktase spielt deshalb eine Rolle in der Regulation des Wachstums von Normal- und Krebszellen.

Die pathophysiologische Relevanz der Selen-abhängigen Reaktionen ist durch Beobachtung von Selenmangelerscheinungen bei Menschen und Tieren belegt. Ein Mangel an diesem Spurenelement verstärkt oxidativ oder chemisch induzierte Leberschäden sowie die Toxizität von Schwermetallen wie Quecksilber und Cadmium.

Als Selenmangelerscheinungen werden beim Menschen die Keshan-Krankheit, eine endemisch auftretende Kardiomyopathie, und die sogenannte Kaschin-Beck-Krankheit beschrieben, eine ebenfalls endemisch auftretende Osteoarthropathie mit starken Verformungen der Gelenke. Klinisch manifestierter Selenmangel wurde auch als Folge von langandauernder parenteraler Ernährung und von bilanzierten Diäten beobachtet. Dabei traten vor allem Kardiomyopathien und Myopathien der Skelettmuskulatur sowie eine Verschiebung des  $T_3/T_4$ -Verhältnisses auf.

Epidemiologische Untersuchungen deuten auf eine inverse Korrelation zwischen Blut-Selen-Spiegel und der Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Kardiomyopathien, Arteriosklerose, Myocardinfarkt) sowie von Tumorerkrankungen, besonders des Verdauungstraktes, der Brust und der Leber hin. Erniedrigte Plasma-Selenspiegel können bei Patienten mit Niereninsuffizienz sowie bei gastrointestinalen Erkrankungen vorliegen. Ein Selenmangel kann durch einen erniedrigten Vollblut- oder Plasma-Selen-Spiegel und durch erniedrigte Glutathionperoxidase-Aktivität in Vollblut, Plasma oder Thrombozyten nachgewiesen werden.

Selensubstitution bei Mangelerscheinungen aktiviert Reaktionen der Immunabwehr, insbesondere die unspezifischen, zellgebundenen und humoralen Reaktionen. Die Selen-haltige Glutathionperoxidase beeinflusst den Leukotrien-, Thromboxan- und Prostacyclin-Stoffwechsel. Im folgenden sind die immunmodulatorischen Effekte von Selen-haltigen Verbindungen aufgeführt:

- Stimulation der Lymphozyten-Proliferation

- Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen
- Erhöhung der Interleukin-2-Rezeptorexpression
- selektive Senkung der T-Suppressorzellzahl
- Erhöhung der Interferon- $\gamma$ -Synthese
- allgemeine Senkung der Infektionshäufigkeit

Selen in Form von Selenit ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ) wird nicht direkt in Proteine eingebaut. Im Blut wird Selenit zuerst hauptsächlich von den Erythrozyten aufgenommen und enzymatisch zu Selenwasserstoff reduziert. Selenwasserstoff dient als zentraler Selen-Pool für die Ausscheidung und für den gezielten Einbau in Selenoproteine. In dieser reduzierten Form wird Selen an Plasmaproteine gebunden, die in die Leber und andere Organe wandern. Der von der Leber ausgehende plasmatische Sekundärtransport in die Glutathionperoxidase-synthetisierenden Zielgewebe geschieht wahrscheinlich in Form eines Selenocystein-haltigen P-Selenoproteins. Der weitere metabolische Verlauf der Selenoprotein-Biosynthese ist bisher nur aus prokaryontischen Modellorganismen bekannt. In diesen wird Selenocystein im Verlauf der Translation spezifisch in die Peptidkette der Glutathionperoxidase eingebaut.

Überschüssiger Selenwasserstoff wird beim Menschen über Methylselenol und Dimethylselenid zum Trimethylselenonium-Ion, dem Hauptausscheidungsprodukt, metabolisiert. Selenit wird nach oraler Applikation vorwiegend aus dem Dünndarm absorbiert. Die intestinale Absorption von Natriumselenit ist nicht homöostatisch reguliert. Sie beträgt in Abhängigkeit von der Konzentration und von Begleitsubstanzen zwischen 44% und 89%, gelegentlich über 90%. Die Aminosäure Cystein fördert die Natriumselenit-Absorption.

Organische Selenverbindungen müssen ebenfalls zuerst in Selenwasserstoff umgewandelt werden, bevor sie für die Synthese von Selenoproteinen zur Verfügung stehen. Das in der Nahrung hauptsächlich enthaltene Selenomethionin kann auch anstelle von Methionin bei der Proteinbiosynthese unspezifisch in nicht selenhaltige Proteine statistisch eingebaut werden.



Die Gesamtmenge an Selen im menschlichen Körper liegt bei einem ausgeglichenen Selen-Haushalt zwischen 4 mg und 20 mg. Die Ausscheidung von Selen erfolgt beim Menschen je nach applizierter Dosis über den Urin, die Fäzes und über die Lunge. In erster Linie wird Selen in Form der oben erwähnten Trimethylselenonium-Ionen renal ausgeschieden.

Beim Menschen wurden akute Selenintoxikationen bisher selten beschrieben. Als Anzeichen einer akuten Überdosierung gelten knoblauchartiger Atemgeruch, Müdigkeit, Übelkeit, Diarrhö und abdominale Schmerzen. Aus Beobachtungen zur chronischen Toxizität von Selen beim Menschen wurde eine maximale sichere tägliche Aufnahme von Selen von 820 µg abgeleitet, während eine Dosierung von bis zu 550 µg pro Tag auch bei empfindlichen Personen als unbedenklich angesehen wird. Als klinische Anzeichen der endemisch auftretenden Selenose wurden bei einer Studie in China nach täglicher Zufuhr von 3200-6700 µg Selen Haarausfall, Brüchigkeit der Fingernägel, Hautveränderungen und Störungen des Nervensystems beobachtet. Bei verschiedenen Spezies wurde als Symptom der Selenose eine Einschränkung der Reproduktionsfähigkeit aufgrund verringerter Motilität der Spermatozoen beschrieben.

In einer Dosis-Eskalationsstudie wurden bei Tumorpatienten zwischen 10 und 50 mg Selen in Form von Natriumselenit-Pentahydrat infundiert. Innerhalb von 30 Minuten stieg der Plasmaselenspiegel nach Gabe von 10 mg Selen als Natriumselenit von 200 µg/l auf 1200 µg/l. Nach 8 und 16 Stunden war das Plasmaselen auf 770 bzw. 430 µg/l abgesunken. Nach 24 Stunden hatte der Plasmaselenspiegel wieder seinen Ausgangswert erreicht. Die gastro-intestinale Toxizität trat ab etwa 20 mg Selen als Natriumselenit auf und war nach Absetzen des Präparates reversibel (Röhler H., 1989, Erfahrungsheilkunde 38: 10a, 761).

Als Gegenmaßnahmen im Falle einer Vergiftung kommen Magenspülung, erzwungene Diurese oder hochdosierte Vitamin C-Gaben in Frage. Bei extremer Überdosierung (1000-10000-fach) kann versucht werden, das Selenit durch Dialyse zu eliminieren.

Das Spurenelement Selen wird von Menschen vorwiegend durch den Verzehr von Eigelb, Fisch und Fleisch, besonders vom Huhn und Schwein, sowie Innereien aufgenommen. Die minimale notwendige Selenzufuhr des Menschen hängt ab von der che-

mischen Form des aufgenommenen Elementes und von der Zusammensetzung der Diät, in der es vorliegt. In China wurde experimentell eine Menge von 15-20 µg Selen pro Tag als ausreichend ermittelt, um vor endemischen Selenmangelkrankheiten zu schützen. Der National Research Council (NRC) der USA empfiehlt für Männer eine tägliche Zufuhr von 70 µg Selen, für Frauen 55 µg Selen. Der NRC stufte früher (bis 1989) Tagesmengen von 50-200 µg Selen als angemessen und unbedenklich ein. Die deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt 20-100 µg Selen täglich.

Die tägliche durchschnittliche Selenzufuhr, zu 2/3 gedeckt durch die Zufuhr von tierischem Eiweiß, liegt in den alten Bundesländern Deutschlands bei 38 µg für Frauen und 47 µg für Männer. Im Gebiet der neuen Bundesländer wurden hingegen Werte von 20-25 µg Selen ermittelt. Diese Zahlen belegen, daß die nutritive Selenzufuhr in Deutschland nicht immer gedeckt ist. Das Risiko einer unzureichenden Versorgung mit Selen besteht besonders in Situationen mit erhöhtem Bedarf (z.B. Schwangerschaft und Stillzeit), bei Personen unter Schwermetall- und Oxidanzienbelastung, bei Patienten mit gastrointestinalen Komplikationen (z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen) und bei parenteral oder mit besonderen Diäten (z.B. bei Phenylketonurie) ernährten Personen.

Epidemiologische Studien haben gezeigt, daß geringe Selenaufnahme und entsprechend geringe Selen-Blutplasmakonzentration mit einem erhöhten Auftreten verschiedener Krebsarten beim Menschen in Zusammenhang stehen (Glattre et al., 1989, Int. J. Epidemiol., 18:45-49; Knekt et al., 1990; J. Natl. Cancer Inst., 82:864-868; Burney et al., 1997, J. Clin. Nutr., 49:895-900). Es wurde ebenfalls gezeigt, daß Selen in hohen Dosen (10-100 µM) das Wachstum verschiedener Tumorzellen, z.B. bei menschlichen Brustkrebszellen, Eierstockkrebszellen und Darmkrebszellen, in vitro deutlich inhibieren kann (Yan et al., 1991; Biol. Trace Elem. Res., 30:145-162; Chen et al., 1995, FASEB J., 9(3): A159; Nano et al., 1989, Biol. Trace Elem. Res. 20: 31-43; Stewart et al., 1997, Cancer Lett., 117:35-40). Im Gegensatz dazu berichten mehrere Wissenschaftler von einem wachstumsstimulierenden Effekt geringer Mengen an Natriumselenit (0,001-1 µM) auf verschiedene Tumorzellen, die unter serumfreien Bedingungen inkubiert würden (Nano et al., 1989, Biol. Trace Elem. Res., 20:31-43; Golczewski und Frenkel, 1989, Biol. Trace Elem. Res. 20:115-126). Des weiteren wurde beobachtet, daß organische Selenverbindungen eine präventive Wirkung in bezug auf die Tumorentwicklung

von Mammakarzinomen in Mäusen und Ratten ausüben (El-Bayoumy et al., 1995, J. Cell. Biochemistry, Anhang 22: 29-100). Der Mechanismus, durch den Selen die Tumorphroliferation bzw. -regression beeinflusst, ist nicht näher bekannt. Es wird jedoch vermutet, daß die Induktion von DNA-Strangbrüchen und Apoptose, welche durch Selen und/oder Selenmetabolite, wie Selenodiglutathion und Hydrogenselenid sowie durch die Bildung von Selenoproteinen, wie Glutathionperoxidase und Thioredoxinreduktase eine wichtige Rolle dabei spielen (Thompson et al., 1994, Carcinogenesis 15:183-186; Wu et al., 1995, Carcinogenesis 16: 1579-1584; Lu et al., 1994, Biochem. Pharmacol., 47:1531-1535; Milner, 1985, Fed. Proc., 44: 2568-2572 ; Schrauzer, 1992, Biol. Trace Elem. Res., 33:51-62; Gallegos et al., 1997, Cancer Res., 75:4965-4979). So könnte z.B. eine Erhöhung der Thioredoxinreduktase-Aktivität durch Selen die zelluläre Thioredoxinkonzentration senken und daher die Regulation des Wachstums von Krebszellen beeinflussen (Gallegos et al., 1997, Cancer Res., 75: 4965-4979).

In Kombinationsexperimenten wurde beobachtet, daß die Verabreichung geringer Mengen an Selen bzw. Selen-haltigen Verbindungen zusammen mit Zytostatika keine Senkung des antitumoralen Effektes bewirkt, jedoch die durch Zytostatika bedingten Nebenwirkungen, wie Nephrotoxizität oder Kardiotoxizität erheblich zu reduzieren vermag.

Während für einige Krebsarten bereits recht wirksame Therapieverfahren entwickelt werden konnten, - die Mortalitätsrate nach Darmkrebserkrankung konnte z.B. zwischen 1992 bis 1993 um ungefähr 17% gesenkt werden - steht für die überwiegende Mehrheit von Krebsarten bisher noch gar keine oder eine nur sehr unzureichende Therapie zur Verfügung.

Neben der operativen Entfernung des Tumors und der Strahlentherapie gilt die Chemotherapie als das bisher wirksamste Therapieverfahren. Chemotherapeutische Medikamente lassen sich im wesentlichen in die folgenden vier Gruppen einteilen: Antimetabolite, Topoisomerase-Inhibitoren, alkylierende Mittel und Pflanzenalkaloide, wobei die drei erstgenannten Gruppen eine korrekte Replikation der Erbsubstanz verhindern und die letzte Gruppe Mitose-inhibierend wirkt. Bei der Behandlung vor allem solider Tumore reicht die Wirkung der Zytostatika meistens nicht aus, um die Tumore kurativ zu behandeln.



Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Möglichkeit anzugeben, bei antitumoralen Wirkstoffen eine Wirkungssteigerung zu erzielen sowie diese Wirkstoffe in geeigneter Darreichungsform bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird durch die Verwendung von Selen und/oder mindestens einer Selenverbindung zur Wirkungssteigerung eines Zytostatikums oder einer Mischung von Zytostatika gelöst.

Weiterhin wird die Aufgabe gelöst durch das Bereitstellen eines Kits, umfassend Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung und ein Zytostatikum oder eine Mischung von Zytostatika als Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Anwendung in der zytostatischen Therapie.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Selen und/oder mindestens einer Selenverbindung zur Wirkungssteigerung eines Zytostatikums oder einer Mischung von Zytostatika. Die im folgenden aufgeführten Beispiele demonstrieren, daß in vitro eine gleichzeitige Behandlung mit den oben genannten Komponenten überraschend zu einem deutlichen synergistischen, d.h. überadditiven antitumoralen Effekt führt.

Es werden organische und anorganische Selenverbindungen zur Kombination mit Zytostatika eingesetzt. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine organische Selenverbindung verwendet. Die Verwendung von organischen Selenverbindungen soll dabei der Senkung der Toxizität gegenüber anorganischen Selenverbindungen bei gleicher oder verbesserter antitumoraler Wirksamkeit dienen. Besonders bevorzugt sind die Selenamino-säuren Selenomethionin und Selenocystein sowie die Verbindung Phenylbis(methylen)selenocyanat sowie Derivate davon (El-Bayonmi et al., 1995, J. Cell. Biochemistry, Anhang 22: 92-100). Die letztgenannte Verbindung inhibiert Thymidinkinase in menschlichen Mammakarzinomzelllinien. Des weiteren wurde darüber berichtet, daß diese Verbindung eine Hemmung des Zellwachstums sowie die Induktion des Zelltods durch Apoptose auslösen kann.

Weiterhin wird ein Selenoxid als Selenverbindung bevorzugt, um eine Wirkungssteigerung eines Zytostatikums oder einer Mischung von Zytostatika zu erzielen. In einer be-

sonders bevorzugten Ausführungsform ist die Selenverbindung ein Salz von  $\text{SeO}_2$ , z.B. das Salz  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .

Das Zytostatikum, welches zusammen mit Selen bzw. einer Selenverbindung verwendet wird, kann ein Mitose-hemmendes Zytostatikum sein. Beispiele für diese Gruppe sind u.a. Substanzen, wie Vinblastin und Vinorelbin.

Das zusammen mit Selen bzw. einer Selenverbindung verwendete Zytostatikum kann ebenfalls ein Nukleinsäuresynthese-hemmendes Zytostatikum sein, z.B. Methotrexat und Fluoruracil, welche zur Gruppe der Antimetabolite gehören oder der Topoisomerase-Inhibitor Topotecan, mRNA-Syntheseinhibitoren wie Doxorubicin oder alkylierende Mittel, wie Cyclophosphamid und Chlorambucil. In der folgenden Tabelle sind Beispiele verschiedener Zytostatika, geordnet nach ihren Wirkungsmechanismen, aufgeführt, die geeignet sind zur gemeinsamen Verabreichung mit Selenverbindungen. Dabei können ebenfalls Kombinationen mehrerer verschiedener Zytostatika gemeinsam mit Selenverbindungen verwendet werden.

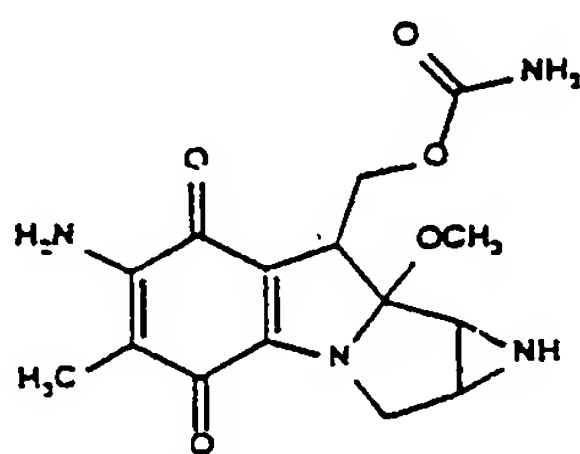
| Effekt auf              | Wirkmechanismus   | Zytostatika-Gruppen und Substanzbeispiele   | Dosierungsbereiche   |
|-------------------------|---|---|--|
| <b>DNS-Bio-Synthese</b> | <u>Enzyminhibition</u><br>- Dihydrofolatreduktase<br><br>- Thymidylatsynthase<br><br>- DNS-Polymerase<br><br>- Ribonukleotidreduktase | <b>Antimetaboliten</b><br>⇒ Methotrexat<br><br>⇒ 5-FU<br><br>⇒ ZD1694 (Tomudex)<br>⇒ Capecitabin<br>⇒ Gemcitabin<br>⇒ Cytosin-Arabinosid<br><br>⇒ Hydroxyharnstoff<br>⇒ 6-Mercaptopurin | ⇒ 20-40 mg/m <sup>2</sup> /d i.v.<br>HD: 12 g/m <sup>2</sup><br><br>⇒ 500-600 mg/m <sup>2</sup> i.v. oder 2-2,6 g/m <sup>2</sup> i.v. (24-h-Inf)<br>⇒ 3 mg/m <sup>2</sup> /d i.v.<br>⇒ ca. 500 mg/m <sup>2</sup> /d p.o.<br>⇒ 1000-1250 mg/m <sup>2</sup> i.v.<br>⇒ 200 mg/m <sup>2</sup> /d i.v.<br>HD: 3 g/m <sup>2</sup><br>⇒ 800-1600 mg/m <sup>2</sup> /d p.o.<br>⇒ 100 mg/m <sup>2</sup> /d p.o. |
| <b>DNS</b>              | <u>Induktion von Strangbrüchen</u><br>- Zwischenstrangvernetzung<br>- Interkalation   | <b>Alkylanzien</b><br><br>Mustargen<br><br>Estramustinphosphat<br><br>Melfalan  | ⇒ 6 mg/m <sup>2</sup><br><br>⇒ 480-550 mg/m <sup>2</sup> /d p.o. 150-200 mg/m <sup>2</sup> /d i.v.<br>⇒ 8-10 mg/m <sup>2</sup> /d p.o.<br>15 mg/m <sup>2</sup> /d i.v.   |

|                |   |  |  |
|----------------|---|--|--|
|                |   | Chlorambucil<br>Prednimustin<br><br>Cyclophosphamid<br><br>Ifosfamid<br>Trofosfamid<br><br>Busulfan<br>Treosulfan<br><br>Thiotepa<br>Carmustin<br>Lomustin<br>Nimustin<br>Dacarbazin<br>Procarbazin<br>Topotecan<br>Irinotecan<br><b>Platinkomplexe</b><br>Cisplatin<br><br>Carboplatin<br>Oxaliplatin<br><b>Antibiotika (s.u.)</b><br><b>Epipodophyllotoxine</b><br>Etoposid<br>Teniposid | $\Rightarrow 3-6 \text{ mg/m}^2/\text{d p.o.}$<br>$\Rightarrow 40 \text{ mg/m}^2/\text{d p.o. oder } 60-100 \text{ mg/m}^2/\text{d p.o.}$<br>$\Rightarrow 750-1200 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v. oder } 50-100 \text{ mg/m}^2/\text{d p.o.}$<br>HD: $2,4 \text{ g/m}^2 \text{ i.v.}$<br>$\Rightarrow 1500-2000 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v.}$<br>$\Rightarrow 150-200 \text{ mg/m}^2/\text{d p.o. initial dann } 25-100 \text{ mg/m}^2$<br>$\Rightarrow 2-6 \text{ mg/m}^2/\text{d p.o.}$<br>$\Rightarrow 5-8 \text{ g/m}^2/\text{d i.v. oder } 1500 \text{ mg/m}^2/\text{d p.o.}$<br>$\Rightarrow 12-16 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br>$\Rightarrow 100 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v.}$<br>$\Rightarrow 100 \text{ mg/m}^2 \text{ p.o.}$<br>$\Rightarrow 90-100 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br>$\Rightarrow 100-200 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v.}$<br>$\Rightarrow 100 \text{ mg/m}^2/\text{d p.o.}$<br>$\Rightarrow 1,5 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v.}$<br>$\Rightarrow 100-350 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br><br>$\Rightarrow 20 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v. oder } 80-120 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v.}$<br>$\Rightarrow 300-400 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br>$\Rightarrow 80-135 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br><br>$\Rightarrow 100-200 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v.}$<br>$\Rightarrow 20-30 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v.}$ |
| <b>RNS</b>     | <u>Blockade der mRNS-Synthese</u> durch Interkalation<br><br><u>Einbau in RNS</u>               | <b>Antibiotika</b><br>Aclarubicin<br>Bleomycin<br>Actinomycin D (Dactinomycin)<br><br>Daunorubicin<br>Doxorubicin<br>Epirubicin<br>Idarubicin<br><br>Mitoxantron<br>Mitomycin C<br><b>Antimetaboliten (s.o.)</b>   | $\Rightarrow 25-100 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br>$\Rightarrow 10-15 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br>$\Rightarrow 0,6 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v.}$<br><br>$\Rightarrow 45-60 \text{ mg/m}^2/\text{d i.v.}$<br>$\Rightarrow 45-60 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br>$\Rightarrow 60-80 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br>$\Rightarrow 10-12 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v. oder } 35-50 \text{ mg/m}^2 \text{ p.o.}$<br>$\Rightarrow 10-12 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br>$\Rightarrow 10-20 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$   |
| <b>Protein</b> | <u>Modifikationen der Rezeptorbindungen</u><br><br><u>Inhibition der Tubulin-Polymerisation</u> | <b>Hormone &amp; Antagonisten</b><br><b>Vitamin-A-Säure-Deriv.</b><br>Tretinoin<br><b>Vincaalkaloide</b><br><br>Vincristin   | $\Rightarrow 45 \text{ mg/m}^2$<br>--<br><br>$\Rightarrow 1,5-2,0 \text{ mg i.v.}$<br>$\Rightarrow 2-3 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$  |

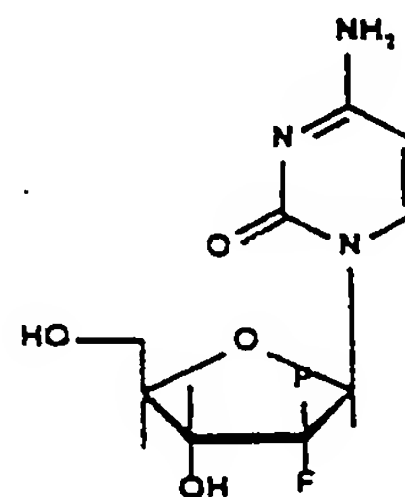
|   |   |   |
|---|---|---|
| <u>Proteinvernetzung</u><br><u>Phosphorylierung</u> | Vindesin<br>Vinblastin<br>Vinorelbin<br><b>Taxane</b><br>Taxol (Paclitaxel)<br>Taxotere (Docetaxel) | $\Rightarrow 4-8 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br>$\Rightarrow 25-30 \text{ mg/m}^2$<br>$\Rightarrow 175 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$<br>$\Rightarrow 100 \text{ mg/m}^2 \text{ i.v.}$ |
|   | <b>Alkylanzien (s. o.)</b><br><b>Proteinkinase-C-Inhibitoren</b><br>Miltefosin                      | $\Rightarrow \text{max. } 5 \text{ ml/d, lokale Anwendung}$   |

HD = Hochdosis-Therapie

Ein bevorzugtes Nukleinsäuresynthese-hemmendes Zytostatikum ist Gemcitabin. Ein weiteres ebenfalls bevorzugtes Nukleinsäuresynthese-hemmendes Zytostatikum ist die Verbindung Mitomycin C. Im folgenden sind die Strukturformeln dieser beiden Verbindungen dargestellt:



Mitomycin C



Gemcitabin

Mitomycin C gehört zur Gruppe der alkylierenden Mittel. Nach Reduktion der Chinon-Einheit wird Methanol freigesetzt, was die Öffnung des Aziridinringes zur Bildung eines alkylierenden Metaboliten erleichtert. Ein weiteres alkylierendes Molekül wird durch chemische oder enzymatische Abtrennung der Carbamatseitenketten gebildet. Darüber hinaus ist die Reduktion der Chinon-Einheit an die Bildung reaktiver Sauerstoffmoleküle gebunden, welche ebenfalls einen alkylierenden Effekt haben. Die antitumorale Wirkung von Mitomycin ist hauptsächlich auf die Alkylierung von DNA zurückzuführen.

Gemcitabin ist ein Pyrimidinantimetabolit. Nach Aufnahme in die Zelle wird es zu

2',2'-Difluordeoxycytidintriphosphat metabolisiert. Die Inkorporation von Gemcitabin in die DNA unterbricht die DNA-Strang-Synthese, so daß folglich keine Zellteilung mehr möglich ist.

Gemcitabin und Mitomycin C haben unterschiedliche Wirkweisen, doch interagieren beide Verbindungen direkt mit zellulärer DNA und führen zu Fehlern bzw. dem Abbruch der DNA-Replikation.

Um eine Wirkungssteigerung eines Zytostatikums oder der Kombination mehrerer Zytostatika zu erzielen, wird Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 1,25 mg/kg Körpergewicht, und das Zytostatikum in einer Konzentration von 2 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche bis 240 g/m<sup>2</sup> Körperoberfläche verwendet. Dabei liegt die bevorzugte Konzentration von Selen bzw. einer Selenverbindung in einem Bereich von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 0,3 mg/kg Körpergewicht, und die des Zytostatikums in einem Bereich von 20 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche bis 1000 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche.

Der Einsatz der genannten Kombination in der zytostatischen Therapie ist besonders bevorzugt.

Des weiteren stellt die Erfindung einen Kit zur Verfügung, welcher Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung und ein Zytostatikum oder eine Mischung von Zytostatika als Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Anwendung in der zytostatischen Therapie umfaßt. Dabei ist bevorzugt, daß die im Kit enthaltene Selenverbindung eine organische Selenverbindung ist. Besonders bevorzugte organische Selenverbindungen sind die Selenaminosäuren Selenomethionin und Selenocystein sowie die Verbindung Phenylenbis(methylen)selencyanat. Darüber hinaus wird in einer weiteren Ausführungsform als Selenverbindung ein Selenoxid bevorzugt. Besonders bevorzugt ist dabei ein Salz von SeO<sub>2</sub>, z.B. Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.

Weiterhin kann der oben erwähnte Kit ein Zytostatikum enthalten, welches ein Mitose-hemmendes Zytostatikum, z.B. ausgewählt aus den oben erwähnten Verbindungen, ist. Des weiteren kann das Zytostatikum ebenfalls ein Nukleinsäuresynthese-hemmendes



Zytostatikum sein. Dabei sind die Verbindungen Gemcitabin und Mitomycin C besonders bevorzugte Nukleinsäuresynthese-hemmende Zytostatika.

Der erfindungsgemäße Kit enthält Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 1,25 mg/kg Körpergewicht und ein wie oben beschriebenes Zytostatikum in einer Konzentration von 2 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche bis 240 g/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Dabei ist ein Konzentrationsbereich von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 0,3 mg/kg Körpergewicht für Selen bzw. eine Selenverbindung und ein Konzentrationsbereich von 20 mg/kg Körpergewicht bis 1000 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche eines wie oben charakterisierten Zytostatikums bevorzugt.

Die Kombinationen aus Selenverbindung und Zytostatikum bzw. mehreren Zytostatika können in fester oder flüssiger Form verabreicht werden. Dabei kann die Applikation oral, rectal, nasal, topical (einschließlich buccal und sublingual), vaginal oder parenteral (einschließlich intramuskulär, subcutan und intravenös) oder durch Inhalation erfolgen. Sie können dabei zusammen mit herkömmlichen Adjuvantien, Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln angeboten werden.

Die festen Darreichungsformen umfassen Tabletten, Kapseln, Pulver, Pillen, Pastillen, Suppositorien und gekörnte Darreichungsformen. Sie können ebenfalls Zusatzstoffe, wie Geschmacksstoffe, Farbstoffe, Verdünnungsmittel, Weichmacher, Bindemittel, Konservierungsmittel, Sprengmittel und/oder umschließende Materialien miteinschließen.

Flüssige Darreichungsformen umfassen Lösungen, Suspensionen und Emulsionen. Diese könne ebenfalls zusammen mit den obengenannten Zusatzstoffen angeboten werden.

Die folgenden Figuren und Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung.

Fig. 1: Effekt von Natriumselenit (3 µM und 30 µM) auf die Koloniebildung von pankreatischen Tumorexotransplantaten (PAXF 546 und 736) in dem klonogenen in vi-  
tro-Test in verschiedenen Experimenten. T/C = Anzahl an Tumorkolonien in Selen-behandelten Proben geteilt durch die Anzahl an Kolonien in den unbehandelten Proben in %.

Fig. 2: Effekt von Selen oder Mitomycin C alleine oder zusammen auf das in vitro-Wachstum des pankreatischen Tumorexenotransplantates PAXF 546 (klonogener Test, kontinuierliche Wirkstoffexposition) A - C: Dosis/Wirkungs-Kurven von Mitomycin C und Mytomycin C in Kombination mit 3  $\mu$ M Selen (A) oder 30  $\mu$ M Selen (B, C). Der Effekt von Selen alleine ist durch gestrichelte Linien angedeutet.

Fig. 3: Vergleich der experimentell beobachteten und erwarteten T/C-Werte von Selen/Mitomycin C-Kombinationen. Erwartete T/C-Werte für einen additiven Wirkungseffekt sind als offene Balken dargestellt, experimentell beobachtete T/C-Werte als ausgefüllte Balken; \* bezeichnete einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen  $T/C_{\text{erwartet}}$  und  $T/C_{\text{beobachtet}}$  und daher einen Wirkstoffsynergismus. A-C: Kombination von Mitomycin C mit 3  $\mu$ M Selen (A) oder 30  $\mu$ M Selen (B, C).

Fig. 4: Effekt von Selen und Gemcitabin alleine oder in Kombination auf das in vitro-Wachstum des pankreatischen Tumorexenotransplantates PAXF 546 (klonogener Test, kontinuierliche Wirkstoffexposition). A-C: Dosis/ Wirkungs-Kurve von Gemcitabin alleine und Gemcitabin in Kombination mit 3  $\mu$ M Selen (A) oder 30  $\mu$ M Selen (B, C). Der Effekt von Selen alleine wird durch gestrichelte Linien angedeutet.

Fig. 5: Vergleich der experimentell beobachteten und erwarteten T/C-Werte von Selen/Gemcitabin-Kombinationen. Erwartete T/C-Werte für den additiven Wirkungseffekt sind als offene Balken dargestellt, experimentell beobachtete T/C-Werte als ausgefüllte Balken; \* weist auf einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen  $T/C_{\text{erwartet}}$  und  $T/C_{\text{beobachtet}}$  und daher Wirkstoffsynergismus hin. A/C: Kombination von Gemcitabin mit 3  $\mu$ M Selen (A) oder 30  $\mu$ M Selen (B, C).

### Beispiele:

#### 1. Material und Methoden

Natriumselenit (Selenase<sup>®</sup>) wurde von der G. N. Pharm GmbH, Fellbach, Deutschland zur Verfügung gestellt. Die 0,9 %-ige NaCl-Lösung enthielt 50  $\mu$ g/ml (0,63 mM) an Selen

als  $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ . Gemcitabin und Mitomycin C wurden von einer Apotheke bezogen und als klinische Formulierungen benutzt.

### 1.1 Koloniebildungstest

#### Herstellung einer Einzelzellsuspension von menschlichen Xenotransplantaten

Solide menschliche Tumorexentransplantate, die subkutan in seriellen Passagen in Thymus-aplastischen Nacktmäusen (NMRI nu/nu-Stamm; aus eigener Zucht) wuchsen, wurden unter sterilen Bedingungen entfernt, die Zellen mechanisch vereinzelt und anschließend mit einem Enzymgemisch, bestehend aus Kollagenase (1,2-1,8 E/ml, Worthington), DNase (375 E/ml, Boehringer Mannheim) und Hyaluronidase (29 E/ml, Boehringer Mannheim) in RPMI 1640 bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Zellmischung wurde durch Siebe mit 200 µm und 50 µm Porengröße passiert und danach zweimal mit PBS gewaschen. Der Prozentsatz an lebenden Zellen wurde in einer Neubauer-Zellkammer unter Verwendung von Trypanblau-Ausschluß bestimmt.

### 1.2 Kultivierungsverfahren

Der klonogene Test wurde gemäß dem von Hamburger und Salmon beschriebenen modifizierten 2-Lagen Soft-Agar-Test durchgeführt (Hamburger und Salmon, Science, 197: 461-463, 1977). Die untere Schicht bestand aus 0,2 ml Iscoves's Modified Dulbecco's Medium mit 20% fötalem Kälberserum und 0,75% Agar.  $8 \times 10^3$  bis  $1,6 \times 10^4$  Zellen wurden zu 0,2 ml desselben Mediums zusammen mit 0,4% Agar zugesetzt und in bereits beschichtete 24-multiwell-Platten gegeben. Testsubstanzen wurden durch fortgesetzte Exposition (drug overlay) in 0,2 ml Medium zugesetzt. Jede Schale schloß 6 Kontrollvertiefungen ein, welche die mit Trägersubstanz und Testsubstanz behandelten Gruppen in 6 Konzentrationen in 3-facher Ausführung enthielten.

Die Kulturen wurden bei 37° und 7%  $\text{CO}_2$  in einer humidifizierten Atmosphäre für 5 bis 15 Tage, abhängig von der Verdopplungszeit der Tumorstammzellen, inkubiert und das Koloniewachstum wurde unter einem Inversmikroskop beobachtet. In dieser Zeitspanne führte das in vitro-Tumorstammwachstum zu der Bildung von Kolonien mit einem Durchmesser von  $\geq 50$  µm. Wenn maximale Koloniebildung erreicht war, wurden Zählungen mit einem

automatischen Bildanalysesystem (OMNICOM Fas IV, Biosys GmbH) durchgeführt. 24 Stunden vor diesem Test wurden lebende Kolonien mit einer sterilen wäßrigen Lösung an 2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (1 mg/ml, 100 µl/Vertiefung) angefärbt. Der Effekt der Testsubstanzen wurde dargestellt als Prozent der überlebenden Zellen, erhalten durch Vergleich der durchschnittlichen Koloniezahlen der behandelten Platten mit der durchschnittlichen Koloniezahl der unbehandelten Kontrolle (Test-versus-Kontroll-Gruppenwert,  $T/C = \frac{\text{Koloniezahl}_{\text{behandelte Gruppe}}}{\text{Koloniezahl}_{\text{Kontrollgruppe}}}$ ).

Ein Test wurde als aussagekräftig erachtet, wenn die folgenden Kontrollkriterien erfüllt waren:

- durchschnittliche Koloniezahl der Kontrollgruppenplatten für 24-multiwells  $\geq 20$  Kolonien mit einem Koloniedurchmesser von  $\geq 50 \mu\text{m}$ .
- Kolonieüberlebenszahl in Vertiefungen, die mit der Positivreferenzverbindung 5-Fluoruracil (bei einer toxischen Dosis von 1000 µg/ml) behandelt wurden  $< 30\%$  der Kontrollen.
- Koeffizient der Variation in der Kontrollgruppe  $\leq 50\%$ .

$IC_{50}$  und  $IC_{70}$ -Werte wurden durch Auftragen der Verbindungskonzentration gegen Zellüberlebensrate bestimmt. Durchschnittliche  $IC_{50}$  und  $IC_{70}$ -Werte wurden gemäß der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Durchschnittlicher } IC_{50} \text{ und } IC_{70} = \frac{\sum_{x=1}^n \log (IC_{50,70})_x}{n}$$

mit x = spezifischem Tumorexenotransplantat und n = Gesamtzahl an untersuchten Tumorexenotransplantaten. Falls kein  $IC_{50}$  oder  $IC_{70}$ -Wert mit dem untersuchten Dosisbereich bestimmt werden konnte, wurde die höchste bzw. niedrigste untersuchte Konzentration für die Berechnung herangezogen.

### 1.3 Kombinationsstudien

Die Inhibition der Koloniebildung durch die Chemotherapeutika Gemcitabin und Mitomycin C alleine oder in Kombination mit Selen wurden in pankreatischen menschlichen Tumorexenotransplantaten PAXF 546 und 736, unter Verwendung des oben beschriebenen klonogenen Tests untersucht. Jedes Experiment umfaßt 6 Konzentrationen an Chemotherapeutika, 2 Konzentrationen an Selen (3 und 30 µM) und die Kombination aller Dosen mit Selen bei 3 und 30 µM. Alle Verbindungen und Kombinationen wurden dreifach untersucht. Konzentrationen der Chemotherapeutika wurden so gewählt, daß T/C-Werte von 0 bis 100% daraus resultierten. Jedes Experiment wurde zweimal durchgeführt. Die Wirkung einer Kombination von Verbindungen wurde durch Vergleich des experimentellen beobachteten T/C-Wertes einer Selen/Zytostatikum-Kombination ( $T/C_{\text{beobachtet}}(A+B)$ ) mit dem erwarteten T/C-Wert für diese Kombination ( $T/C_{\text{erwartet}}(A+B)$ ) bestimmt, berechnet durch Multiplizieren der Anzahl überlebender Kolonien, erhalten nach Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Einzelsubstanzen (T/C (A) und T/C (B)) unter Verwendung der folgenden Gleichung (Multiplikationsverfahren z.B. beschrieben von Berenbaum, 1989, Pharmacol. Rev., 41:93-141):

$$T/C_{\text{erwartet}}(A+B) = T/C(A) \times T/C(B)/100$$

Für eine Null-interaktive Wirkstoffkombination (additive Wirkungseffekte) ist  $T/C_{\text{erwartet}}(A+B) = T/C_{\text{beobachtet}}(A+B)$ . Eine Wirkstoffkombination ist synergistisch, wenn  $T/C_{\text{beobachtet}}(A+B)$  statistisch signifikant  $> T/C_{\text{erwartet}}(A+B)$  ist. Statistische Signifikanz wurde durch den T-Test bestimmt.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. In vitro-Antitumoraktivität von Natriumselenit auf menschliche Tumorexenotransplantate

Die zytotoxische Aktivität von Natriumselenit wurde unter Verwendung des klonogenen Tests an den folgenden menschlichen Tumorexenotransplantaten untersucht:



**Tabelle 1**

Untersuchte menschliche Tumorexenotransplantate

| Tumor     |            | ursprüngliche Histologie   |
|-----------|------------|--|
| Lunge     | LXFL 529   | nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom                                |
|           | LXFS 650   | kleinzelliges Bronchialkarzinom                                      |
| Brust     | MAXF 401NL | Adenokarzinom, Östrogenrezeptor negativ, Progesteronrezeptor negativ |
|           | MAXF MCF7X | Adenokarzinom, Östrogenrezeptor negativ, Progesteronrezeptor negativ |
| Eierstock | OVXF 899   | Adenokarzinom  |
|           | OVXF 1353  | adenoides Karzinom   |
| Pankreas  | PAXF 546   | adenosquamöses Karzinom  |
|           | PAXF 736   | Adenokarzinom  |
| Prostata  | PC3MX      | Adenokarzinom  |
|           | DU145X     | Karzinom   |
| Niere     | RXF 393    | Hypernephrom   |
|           | RXF 944LX  | Hypernephrom   |

Es wurden Natriumselenitkonzentrationen zwischen 0,001 und 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. T/C-Werte, die in den verschiedenen Tumorexenotransplantaten erhalten wurden, sind in Tabelle 2 gezeigt.  $\text{IC}_{50}$  und  $\text{IC}_{70}$ -Werte sowie ein  $\text{IC}_{70}$ -Balkendiagramm, welches die Sensitivität der verschiedenen Tumore gegenüber Selenbehandlung zeigt, sind in Tabelle 3 angegeben.

Die Inhibition der Koloniebildung hängt von der Selendosis ab. Bis zu 1  $\mu\text{M}$  konnte kein deutlicher zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Bei 10  $\mu\text{M}$  Selen wurden T/C-Werte zwischen 30% in 2 von 12 Xenotransplantaten (LXFL 529, PRXF DU145X) erhalten. Bei sehr hohen Selenkonzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  wurden T/C-Werte unter 20% in allen Xenotransplantaten erreicht, was auf einen unspezifisch zytotoxischen Effekt hinweist.

Tabelle 2

In vitro-Effekt von Natriumselenit auf menschliche Tumorexenotransplantate

| TUMOR/<br>PASSAGE<br>Nr. | EXP.<br>Nr. | Test/Kontrolle (%) bei Wirkstoffkonzentration [ $\mu$ M] |       |       |       |       |        |
|--------------------------|-------------|--|-------|-------|-------|-------|--------|
|                          |             | .001   | .01   | .1    | 1.    | 10.   | 100.   |
| LXFL<br>529/18           | X182AM      | 90 -   | 78 -  | 72 -  | 61 -  | 9 +++ | 0 +++  |
| LXFS<br>650/9            | X199AM      | 100 -  | 100 - | 98 -  | 84 -  | 109 - | 16 ++  |
| MAXF<br>401/16           | X186AM      | 67 s-  | 81 s- | 53 -  | 74 -  | 66 -  | 8 +++  |
| MCF7X/28                 | X218AM      | 93 -   | 85 -  | 90 -  | 78 -  | 97 -  | 0 +++  |
| OVXF<br>899/33           | X185AM      | 80 -   | 79 -  | 66 -  | 70 -  | 73 -  | 1 +++  |
| 1353/17                  | X217AM      | 96 -   | 91 -  | 100 - | 90 -  | 100 - | 0 +++  |
| PAXF<br>546/2            | *(2)        | 82 -   | 112 - | 100 - | 104 - | 88 -  | 2 +++  |
| 736/17                   | X184AM      | 87 -   | 77 -  | 94 -  | 88 -  | 90 -  | 4 +++  |
| PRXF<br>PC3M/3           | X189/AM     | 91 -   | 91 -  | 89 -  | 85 -  | 38 +  | 1 +++  |
| DU145X/15                | X229AM      | 97 -   | 96 -  | 92 -  | 91 -  | 5 +++ | 0 +++  |
| RXF<br>393/9             | X194AM      | 62 -   | 45 -  | 31 +  | 31 +  | 32 +  | 10 +++ |
| 423/16                   | X183AM      | 99 -   | 111 - | 120 - | 92 -  | 110 - | 0 +++  |
| aktiv(++ , +++)/gesamt   |             | 0/12   | 0/12  | 0/12  | 0/12  | 2/12  | 12/12  |
| nur Xenotransplantate    |             | 0%   | 0%    | 0%    | 0%    | 17%   | 100%   |

Tabellenlegende:

LXF Lungen A Adeno, L großzelliges, S kleinzelliges Krebsxenotransplantat;  
 MAXF Brustkrebsxenotransplantat; OVXF Eierstockkrebsxenotransplantat,  
 PAXF Pankreas, PRXF Prostatakrebsxenotransplantat; RXF Nierenkrebsxeno-  
 transplantat

- ( $T/C \geq 50\%$ ); + ( $30\% \leq T/C < 50\%$ ); ++ ( $10\% < T/C < 30\%$ ); +++ ( $T/C \leq 10\%$ ),

s Ergebnis einer Platte

In dem IC<sub>70</sub>-Balkendiagramm (IC<sub>70</sub>-Darstellung, Tabelle 3) sind Abweichungen von einzelnen IC<sub>70</sub>-Werten von dem Durchschnittswert als Balken in logarithmischer Darstel-

lung präsentiert. Balken nach links zeigen  $IC_{70}$ -Werte, die geringer als der Durchschnittswert sind, Balken nach rechts zeigen Werte, die höher als der Durchschnittswert sind. Die  $IC_{70}$ -Darstellung zeigt daher ein charakteristisches anti-proliferatives Profil der Verbindung.

Der durchschnittliche  $IC_{50}$ -Wert von Natriumselenit war  $15,5 \mu M$ , der durchschnittliche  $IC_{70}$ -Wert  $27 \mu M$ . Das entspricht einer Selenkonzentration von  $1,2 \mu g/ml$  (durchschnittlicher  $IC_{50}$ -Wert) und  $2,1 \mu g/ml$  (durchschnittlicher  $IC_{70}$ -Wert). Verglichen mit der Wirksamkeit von Standardchemotherapeutika in diesem Test liegen die Werte im Rahmen der  $IC_{50}$  und  $IC_{70}$ -Werte der alkylierenden Mittel Ifosfamid und Cyclophosphamid. Die meisten anderen Standard-alkylierenden Mittel haben durchschnittliche  $IC_{70}$ -Werte von  $< 0,1 \mu g/ml$ .

Die sensitivsten Tumoxenotransplantate, repräsentiert durch  $IC_{70}$ -Werte und Balken nach links in Tabelle 3, waren das große Lungenzellkrebsxenotransplantat LXFL 529, das Nierenkrebsxenotransplantat RXF 393 und die Prostataxenotransplantate PC3M und DU145X.

Tabelle 3

In vitro-Effekt von Natriumselenit auf menschliche Tumorexenotransplantate

| TUMOR/<br>PASSAGE<br>Nr. | Kolonie-<br>Kontr. | Verteilung von IC <sub>70</sub> , bezogen auf den Durchschnittswert<br>log. Achseneinteilung |      |                             |     |      | IC <sub>50</sub> | IC <sub>70</sub> |
|--------------------------|--------------------|--|------|-----------------------------|-----|------|------------------|------------------|
|                          |                    | *0.01  | *0.1 | Durch-<br>schnitt<br>26.967 | *10 | *100 | μM               | μM               |
| LXFL<br>529/18           | 129                | .  | .    | .                           | .   | .    | 1.627            | 3.945            |
| LXFS<br>650/9            | 107                | .  | .    | .                           | .   | .    | 43.093           | 70.706           |
| MAXF<br>401/16           | 37                 | .  | .    | .                           | .   | .    | 18.873           | 41.753           |
| MCF7X/28                 | 200                | .  | .    | .                           | .   | .    | 30.516           | 49.059           |
| OVXF<br>899/33           | 50                 | .  | .    | .                           | .   | .    | 20.866           | 39.556           |
| 1355/17                  | 120                | .  | .    | .                           | .   | .    | 31.622           | 50.118           |
| PAXF<br>546/2            | 80                 | .  | .    | .                           | .   | .    | 27.660           | 47.251           |
| 736/17                   | 55                 | .  | .    | .                           | .   | .    | 29.182           | 49.851           |
| PRXF<br>PC3M/3           | 140                | .  | .    | .                           | .   | .    | 5.554            | 16.451           |
| DU145X/1                 | 254                | .  | .    | .                           | .   | .    | 2.997            | 5.120            |
| RXF<br>393/9             | 23                 | .  | .    | .                           | .   | .    | n.e.             | 12.328           |
| 423/16                   | 97                 | .  | .    | .                           | .   | .    | 35.111           | 53.366           |
| Durch-<br>schnitt        | n=12               |  |      | 26.967                      |     |      | 15.5             | 27.0             |

## 2.2 In vitro Kombinationsstudien

Um zu untersuchen, ob Selen in der Form von Natriumselenit den anti-proliferativen Effekt von Standardchemotherapeutika potenzieren kann, wurden zwei pankreatische menschliche Tumorexenotransplantate (PAXF 546 und PAXF 736) Gemcitabin, Mitomycin C oder Natriumselenit alleine oder Natriumselenit in Kombination mit einem der beiden Chemotherapeutika ausgesetzt.

Festgelegte Konzentrationen an Natriumselenit (3 oder 30 μM) wurden den Zellen zusammen mit 6 verschiedenen Konzentrationen der Chemotherapeutika zugesetzt. Gemäß den in Tabelle 2 gezeigten Daten wurde erwartet, daß eine Natriumselenitkonzentration von 3 μM die Koloniebildung zweier pankreatischer Tumorzelllinien nur marginal beeinflußt. Dies wurde durch die Ergebnisse bestätigt, wenn Natriumselenit alleine bei dieser Konzentration in den Kombinationsstudien eingesetzt wurde (Figur 1). Die höhere Natriumselenitkonzentration von 30 μM sollte einen stärkeren Einfluß auf die Tumorko-

loniebildung haben, da die Tumorkoloniebildungsrate beider pankreatischer Tumoren schnell abfällt, wenn die Natriumselenitkonzentration von 10 auf 100  $\mu\text{M}$  steigt (Tabelle 2). Dies wird in weiteren Experimenten in Figur 1 gezeigt. Die Abweichung der T/C-Werte bei 30  $\mu\text{M}$  in den beiden Experimenten (Figur 1) wird durch die sehr steilen Dosis/Effekt-Werte von Natriumselenit bei Konzentrationen um 30  $\mu\text{M}$  verursacht. Daher wurden Kombinationsexperimente mit PAXF 546 bei dieser Selenkonzentration getrennt bewertet. Im Falle von PAXF 736 konnte lediglich Experiment X265 für die Bewertung herangezogen werden, da in Experiment X290 30  $\mu\text{M}$  an Selen bereits einen stark zytotoxischen Effekt mit einem T/C-Wert von 5% zeigten.

Die folgenden Tabellen 4a bis 4d zeigen die Ergebnisse der Inkubation zweier pankreatischer Xenotransplantate mit verschiedenen Konzentrationen an Selen und den Zytostatika Mitomycin C und Gemcitabin. Um zu bestimmen, ob eine Wirkstoffkombination einen additiven Effekt der Einzelwirkstoffe aufweist, wurden die experimentell ermittelten T/C-Werte für eine spezifische Kombination mit den Werten, die für einen additiven Effekt erwartet wurden, verglichen (siehe Material und Methoden). Wenn das pankreatische Tumorexotransplantat PAXF 736 gleichzeitig mit Natriumselenit und Mitomycin C oder Gemcitabin behandelt wurde, konnte weder bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  noch bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Natriumselenit ein synergistischer Effekt festgestellt werden. Es wurde ebenfalls kein synergistischer Effekt von 3  $\mu\text{M}$  Natriumselenit und allen der getesteten Konzentrationen an Chemotherapeutika in dem Xenotransplantat PAXF 546 beobachtet oder wenn geringe Konzentrationen der Chemotherapeutika mit 30  $\mu\text{M}$  an Natriumselenit kombiniert wurden. Wurden jedoch höhere Dosierungen der Chemotherapeutika, bei denen zytotoxische Effekte beobachtet werden konnten, zusammen mit 30  $\mu\text{M}$  Natriumselenit eingesetzt, wurde ein Synergismus in Kombination mit Mitomycin C und Gemcitabin beobachtet (Tabelle 4a, 4b).



Tabelle 4a

Inhibition von Koloniewachstum des Pankreaskrebs-Xenotransplantates PAXF 546 durch Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> oder Mitomycin C alleine oder in Kombination *in vitro*

| Behandlung                |                               | Natriumselenit<br>,Konz.<br>in µM | T/C in % bei einer Mitomycin C Konzentration (µM) von |                    |                    |                    |                    |                    | Synergismus |
|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|
|                           |                               |                                   | 1x10 <sup>-6</sup>                                    | 1x10 <sup>-5</sup> | 1x10 <sup>-4</sup> | 1x10 <sup>-3</sup> | 1x10 <sup>-2</sup> | 1x10 <sup>-1</sup> |             |
| Mitomycin C               | (X261, X295)                  |                                   | 87 ± 11   | 84 ± 14            | 70 ± 10            | 70 ± 13            | 80 ± 12            | 57 ± 8             | 5 ± 2       |
| Mitomycin C<br>+ 3 µM Se  | erwart. beob.<br>(X261, X295) | 3.0                               | 84 ± 15   | 84 ± 13            | 72 ± 12            | 66 ± 10            | 60 ± 8             | 60 ± 10            | 4 ± 2       |
|                           | erwartet**                    |                                   | 76 ± 12   | 76 ± 15            | 64 ± 11            | 64 ± 14            | 73 ± 13            | 52 ± 9             | 5 ± 3       |
| Mitomycin C<br>+ 30 µM Se | erwart. beob.<br>(X261)       | 30.0                              | 69 ± 10   | 58 ± 8             | 49 ± 7             | 50 ± 8             | 35 ± 6***          | 3 ± 2              | partiell    |
|                           | erwartet                      |                                   | 70 ± 14   | 67 ± 16            | 56 ± 14            | 56 ± 15            | 64 ± 14            | 46 ± 10            |             |
|                           | erwart. beob.<br>(X295)       | 30.0                              | 38 ± 8  | 37 ± 6             | 31 ± 5             | 30 ± 6             | 26 ± 5             | 14 ± 3             | partiell    |
|                           | erwartet                      |                                   | 43 ± 12   | 41 ± 15            | 34 ± 11            | 34 ± 14            | 39 ± 12            | 28 ± 9             |             |

\* experimentell beobachtete T/C-Werte für die Kombination von Mitomycin C und Selen  
\*\* erwartete T/C-Werte für die Kombination, errechnet durch das Verfahren:  $T/C_{\text{erwartet}} = T/C_{\text{Se}} \times T/C_{\text{Wirkstoff}}/100$ ; T/C: T/C-Wert in %  
bei einer gegebenen Behandlung bei einer spezifischen Konzentration  
\*\*\* synergistische Wirkstoffkonzentrationen sind durch Kursivdruck gekennzeichnet

Tabelle 4b

Inhibition von Koloniewachstum des Pankreaskrebs-Xenotransplantates PAXF 546 durch Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> oder Gemcitabin alleine oder in Kombination *in vitro*

| Behandlung               | Natriumselenit                  | T/C in % bei einer Gemcitabin Konzentration (µM) von |                    |                    |                    |                    |                    | Synergismus |         |          |
|--------------------------|---------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|---------|----------|
|                          |                                 | 1x10 <sup>-6</sup>                                   | 1x10 <sup>-5</sup> | 1x10 <sup>-4</sup> | 1x10 <sup>-3</sup> | 1x10 <sup>-2</sup> | 1x10 <sup>-1</sup> |             | 1.0     |          |
| Gemcitabin               | (X261, X295)                    |  | 85 ± 15            | 73 ± 20            | 80 ± 12            | 83 ± 12            | 61 ± 11            | 48 ± 8      | 30 ± 6  |          |
| Gemcitabin<br>+ 3 µM Se  | erwart. beob. *<br>(X261, X295) | 3.0 91 ± 8   | 86 ± 16            | 93 ± 16            | 70 ± 18            | 72 ± 11            | 50 ± 9             | 41 ± 10     | 30 ± 10 | nein     |
|                          | erwartet**                      |  | 77 ± 17            | 66 ± 23            | 73 ± 14            | 76 ± 14            | 56 ± 12            | 44 ± 10     | 34 ± 8  |          |
| Gemcitabin<br>+ 30 µM Se | erwart. beob.<br>(X261)         | 30.0 80 ± 13   | 74 ± 12            | 57 ± 7             | 58 ± 7             | 40 ± 8***          | 24 ± 7             | 27 ± 4      |         | partiell |
|                          | erwartet †                      |  | 68 ± 17            | 58 ± 23            | 64 ± 15            | 66 ± 15            | 49 ± 14            | 38 ± 12     |         |          |
|                          | erwart. beob.<br>(X295)         | 30.0 49 ± 6  | 55 ± 12            | 41 ± 10            | 50 ± 9             | 23 ± 7             | 23 ± 6             | 11 ± 6      | 10 ± 3  | partiell |
| erwartet                 |                                 | 43 ± 14  | 36 ± 21            | 39 ± 13            | 41 ± 13            | 30 ± 12            | 24 ± 9             | 18 ± 7      |         |          |

\* experimentell beobachtete T/C-Werte für die Kombination von Gemcitabin und Selen  
\*\* erwartete T/C-Werte für die Kombination, errechnet durch das Verfahren:  $T/C_{\text{erwartet}} = T/C_{\text{se}} \times T/C_{\text{Wirkstoff}}/100$ ; T/C: T/C-Wert in %  
bei einer gegebenen Behandlung bei einer spezifischen Konzentration  
\*\*\* synergistische Wirkstoffkonzentrationen sind durch Kursivdruck gekennzeichnet

Tabelle 4c

Inhibition von Koloniewachstum des Pankreaskrebs-Xenotransplantates PAXF 736 durch Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> oder Mitomycin C alleine oder in Kombination *in vitro*

| Behandlung                |                                | Natriumselenit<br>Konz. in µM | T/C in % bei einer Mitomycin C Konzentration von |                    |                    |                    |                    |                    | Synergismus |
|---------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|
|                           |                                |                               | 1x10 <sup>-6</sup>                               | 1x10 <sup>-5</sup> | 1x10 <sup>-4</sup> | 1x10 <sup>-3</sup> | 1x10 <sup>-2</sup> | 1x10 <sup>-1</sup> |             |
| Mitomycin C               | (X261, X295)                   |                               | 77 ± 13  | 58 ± 10            | 56 ± 11            | 46 ± 8             | 30 ± 7             | 11 ± 7             |             |
| Mitomycin C<br>+ 3 µM Se  | erwart. beob.*<br>(X265, X290) | 3.0                           | 90 ± 15  | 60 ± 11            | 56 ± 8             | 48 ± 7             | 29 ± 3             | 10 ± 3             | nein        |
|                           | erwartet**                     |                               | 70 ± 16  | 53 ± 13            | 51 ± 13            | 42 ± 12            | 27 ± 9             | 10 ± 9             |             |
| Mitomycin C<br>+ 30 µM Se | erwart. beob.<br>(X265)        | 30.0                          | 25 ± 10  | 15 ± 7             | 27 ± 7             | 17 ± 6             | 19 ± 6             | 4 ± 3              | nein        |
|                           | erwartet                       |                               | 33 ± 14  | 25 ± 11            | 24 ± 12            | 20 ± 9             | 14 ± 8             | 5 ± 5              |             |
|                           | erwart. beob.<br>(X290)        | 30.0                          | 4 ± 2  | 3 ± 2              | 3 ± 3              | 2 ± 2              | 1 ± 1              | 1 ± 1              | n.b.***     |

\* experimentell beobachtete T/C-Werte für die Kombination von Mitomycin C und Selen  
\*\* erwartete T/C-Werte für die Kombination, errechnet durch das Multiplikationsverfahren:  $T/C_{\text{erwartet}} = T/C_{\text{Se}} \times T/C_{\text{Wirkstoff}}/100$ ; T/C:  
T/C-Wert in % bei einer gegebenen Behandlung bei einer spezifischen Konzentration  
\*\*\* nicht bestätigt

Tabelle 4d

Inhibition von Koloniewachstum des Pankreaskrebs-Xenotransplantates PAXF 736 durch Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> oder Gemcitabin alleine oder in Kombination *in vitro*

| Behandlung               |                                | Natriumselenit<br>Konz. }<br>in µM | T/C in % bei einer Gemcitabin Konzentration (µM) von |                    |                    |                    |                    |                    | Synergismus |
|--------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------|
|                          |                                |                                    | 1x10 <sup>-6</sup>                                   | 1x10 <sup>-5</sup> | 1x10 <sup>-4</sup> | 1x10 <sup>-3</sup> | 1x10 <sup>-2</sup> | 1x10 <sup>-1</sup> |             |
| Gemcitabin               | (X261, X295)                   |                                    | 89 ± 11  | 78 ± 14            | 84 ± 12            | 77 ± 13            | 71 ± 10            | 30 ± 8             |             |
| Gemcitabin<br>+ 3 µM Se  | erwart. beob.*<br>(X265, X290) | 3.0                                | 79 ± 13  | 82 ± 12            | 84 ± 12            | 86 ± 15            | 66 ± 10            | 18 ± 8             | nein        |
|                          | erwartet**                     |                                    | 72 ± 12  | 63 ± 16            | 68 ± 13            | 62 ± 14            | 58 ± 12            | 24 ± 9             |             |
| Gemcitabin<br>+ 30 µM Se | erwart. beob.<br>(X265)        | 30.0                               | 64 ± 15  | 62 ± 20            | 59 ± 13            | 39 ± 7             | 34 ± 6             | 14 ± 5             | nein        |
|                          | erwartet                       |                                    | 38 ± 12  | 34 ± 15            | 36 ± 13            | 33 ± 14            | 31 ± 11            | 13 ± 9             |             |
|                          | erwart. beob.<br>(X290)        | 30.0                               | 9 ± 7  | 5 ± 3              | 4 ± 3              | 5 ± 3              | 3 ± 2              | 1 ± 1              | n.b.***     |

\* experimentell beobachtete T/C-Werte für die Kombination von Gemcitabin und Selen  
\*\* erwartete T/C-Werte für die Kombination, errechnet durch das Multiplikationsverfahren:  $T/C_{\text{erwartet}} = T/C_{\text{Se}} \times T/C_{\text{Wirkstoff/100}}$ ; T/C:  
T/C-Wert in % bei einer gegebenen Behandlung bei einer spezifischen Konzentration  
\*\*\* nicht bestimmt

**Tabelle 5a:**Synergistische Effekte von Selen in Kombination mit Gemcitabin in vitro

| Xenotrans-<br>plantat | Exp. Nr.   | Se Konz.<br>[µM] | Synergismus mit Gemcitabin [µM] |                    |                    |                    |                    |     |       |
|-----------------------|------------|------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----|-------|
|                       |            |                  | 1x10 <sup>-6</sup>              | 1x10 <sup>-5</sup> | 1x10 <sup>-4</sup> | 1x10 <sup>-3</sup> | 1x10 <sup>-2</sup> | 0.1 | 1.0   |
| PAXF 546              | X261, X295 | 3.0              | -*                              | -                  | -                  | -                  | -                  | -   | -     |
|                       | X261       | 30.0             | -                               | -                  | -                  | +                  | +                  | +   | n. b. |
|                       | X295       | 30.0             | -                               | -                  | -                  | +                  | +                  | +   | +     |
| PAXF 736              | X265, X290 | 3.0              | -                               | -                  | -                  | -                  | -                  | -   | n. b. |
|                       | X265       | 30.0             | -                               | -                  | -                  | -                  | -                  | -   | n. b. |
|                       | X290       | 30.0             | nicht bestimmt                  |                    |                    |                    |                    |     |       |

**Tabelle 5b:**Synergistische Effekte von Selen in Kombination mit Mitomycin C in vitro

| Xenotrans-<br>plantat | Exp. Nr.   | Se Konz.<br>[µM] | Synergismus mit Mitomycin C [µM] |                    |                    |                    |                    |     |       |
|-----------------------|------------|------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----|-------|
|                       |            |                  | 1x10 <sup>-6</sup>               | 1x10 <sup>-5</sup> | 1x10 <sup>-4</sup> | 1x10 <sup>-3</sup> | 1x10 <sup>-2</sup> | 0.1 | 1.0   |
| PAXF 546              | X261, X295 | 3.0              | -*                               | -                  | -                  | -                  | -                  | -   | -     |
|                       | X261       | 30.0             | -                                | -                  | -                  | -                  | +                  | +   | n. b. |
|                       | X295       | 30.0             | -                                | -                  | -                  | -                  | +                  | +   | +     |
| PAXF 736              | X265, X290 | 3.0              | -                                | -                  | -                  | -                  | -                  | -   | n. b. |
|                       | X265       | 30.0             | -                                | -                  | -                  | -                  | -                  | -   | n. b. |
|                       | X290       | 30.0             | nicht bestimmt                   |                    |                    |                    |                    |     |       |

\* Der experimentell bestimmte T/C-Wert für eine Wirkstoffkombination ist deutlich geringer (+) oder nicht geringer (-) als der erwartete T/C-Wert für diese Kombination:  
n.b.: nicht bestimmt.

In Figuren 2 und 3 ist der Effekt von Natriumselenit und Mitomycin C auf das in vitro-Wachstum von PAXF 546 dargestellt. Wenn 3 µM Natriumselenit zu verschiedenen Konzentrationen an Mitomycin C zugesetzt wurden, konnte keine Änderung in der Dosis/Wirkungskurve von Mitomycin C beobachtet werden, woraus folgt, daß bei dieser niedrigen Konzentration an Selenit kein Synergismus zwischen den beiden Wirkstoffen auftritt (Figuren 2a und 3a).



Wurden jedoch 30  $\mu$ M Natriumselenit gleichzeitig mit Mitomycin C verabreicht, wurde ein synergistischer Effekt bei Mitomycin C-Konzentrationen  $> 0,01 \mu$ M beobachtet (Figuren 2b, c, 3b, c und Tabelle 5b).

Ähnliche Ergebnisse wurden mit der Kombination von Natriumselenit und Gemcitabin erzielt (Figur 4 und 5, Tabelle 5a). Eine synergistische Inhibition der Koloniebildung in PAXF 546 wurde ebenfalls bei einer Selenkonzentration von 30  $\mu$ M und einer Gemcitabin-Konzentration höher als 0,1 nM festgestellt (Figur 5, Tabelle 5a).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß hohe Dosen an Selen das Wachstum vieler menschlicher Tumoxenotransplantate in vitro reduzieren. Gleichzeitige Behandlung der pankreatischen Krebszellen PAXF 546 mit 30  $\mu$ M Selen und Zytostatika, welche direkt mit der zellulären DNA (z.B. Gemcitabin und Mitomycin C) reagieren, resultiert in einer synergistischen Inhibition des Tumowachstums in vitro.

### 3. Fallstudien

Im folgenden sind die Falldokumentationen von fünf männlichen Tumorpatienten, die eine Kombinationstherapie von hochdosiertem Selen (10-30 mg) und verschiedenen Zytostatika erhielten, aufgeführt. Zwei der Patienten mit Pankreaskarzinom (Patient Nr. 4, 5) zeigten trotz weit fortgeschrittener Erkrankung ein gutes Ansprechen auf die Therapie, ebenso wie zwei Patienten (Patient Nr. 1, 3) mit hormonresistenten metastasierten Prostatakarzinomen. Ein Patient (Patient Nr. 2) mit metastasiertem Hypernephrom reagierte mit einer Teilremission auf die Therapie.

#### Patient Nr. 1

1.) Diagnose: hormonresistentes metastasiertes Prostatakarzinom

2.) Diagnose gestellt (Monat/Jahr): Juni 1994

3.) Histologie: cribriformes Prostatakarzinom, Grad III

4.) Tumorstadium zum Zeitpunkt des Therapiebeginns: T3, N2, M1

- (T = Ausdehnung des Primärtumors  
- N = Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen  
M = Vorhandensein von Fernmetastasen)

5.) Lokalisation der Fernmetastasen: Lymphknoten, Knochen

6.) Tumorvorbehandlung: Hormontherapie von VI/94 bis XI/94

7.) Therapie mit Chemotherapie/Selen:

- a) Chemotherapeutikum: 5-Fluoruracil, 750 mg, i.v., von XI/94 bis V/95  
Mitomycin, 10 mg, i.v., von XI/94 bis V/95
- b) Selen: Selenase®, 10 mg, i.v., von XI/94 bis V/95
- c) Ansprechen der Therapie: Teilremission, vollständiger Rückgang der Lymph  
ödeme
- d) Dauer des Ansprechens: 7 Monate
- e) Grund für Beendigung der Therapie: Progression
- f) Verträglichkeit der Therapie: gut

8.) Vor- und Begleiterkrankungen: koronare Herzkrankheit seit 1991, bei Therapiebeginn noch bestehend

9.) Begleittherapie während Chemo/Selen-Therapie: Kerlone, Adalat von 1991 bis V/95

10.) Überlebensstatus: tot

Todesdatum: 31.08.1994; tumorbedingt

#### Patient Nr. 2

1.) Diagnose: metastasiertes Hypernephrom

2.) Diagnose gestellt (Monat/Jahr): April 1996

3.) Histologie: Hypernephrom

4.) Tumorstadium zum Zeitpunkt des Therapiebeginns: T2, N1, M1

(T = Ausdehnung des Primärtumors

N = Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen

M = Vorhandensein von Fernmetastasen)

5.) Lokalisation der Fernmetastasen: Lunge, Leber

6.) Tumorvorbehandlung:

Nephrektomie 1996; Interleukin-II von IX/97 bis I/98

7.) Therapie mit Chemotherapie/Selen:

a) Chemotherapeutikum: Gemzar, 2 g, i.v., von I/98 bis V/98

b) Selen: Selenase®, 30 mg, i.v. von I/98 bis V/98

c) Ansprechen der Therapie: Teilremission

d) Dauer des Ansprechens: bislang 5 Monate

e) Grund für Beendigung der Therapie: keiner

f) Verträglichkeit der Therapie: gut

8.) Vor- und Begleiterkrankungen: Polyzythämie seit 1990; bei Therapiebeginn noch bestehend

9.) Begleittherapie während Chemo/Selen-Therapie: keine

10.) Überlebensstatus: lebend; zuletzt beobachtet 18.05.1998

### Patient Nr. 3

1.) Diagnose: metastasiertes hormonresistentes Prostatakarzinom

2.) Diagnose gestellt (Monat/Jahr): Mai 1997

3.) Histologie: Adenokarzinom, Grad II

4.) Tumorstadium zum Zeitpunkt des Therapiebeginns: T3, N1, M1

(T = Ausdehnung des Primärtumors

N = Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen

M = Vorhandensein von Fernmetastasen)

5.) Lokalisation der Fernmetastasen: Knochen

6.) Tumovorbehandlung: Orchiektomie beiderseits 1997

7.) Therapie mit Chemotherapie/Selen:

a) Chemotherapeutikum: Adriblastin, 40 mg, i.v., von II/98 bis V/98

b) Selen: Selenase®, 30 mg, i.v., von II/98 bis V/98

c) Ansprechen der Therapie: Vollremission

d) Dauer des Ansprechens: bislang 3 Monate

e) Grund für Beendigung der Therapie: keiner

f) Verträglichkeit der Therapie: gut

8.) Vor- und Begleiterkrankungen: keine

9.) Begleittherapie während Chemo/Selen-Therapie: Bisphosphonat (Bondronat) von II/98 bis V/98

10.) Überlebensstatus: lebend; zuletzt beobachtet 20.05.1998

#### Patient Nr. 4

1.) Diagnose: Pankreaskarzinom

2.) Diagnose gestellt (Monat/Jahr): Oktober 1994

3.) Histologie: Adenokarzinom, Grad II

4.) Tumorstadium zum Zeitpunkt des Therapiebeginns: T4, N1, M0

- (T = Ausdehnung des Primärtumors

N = Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen

M = Vorhandensein von Fernmetastasen)

5.) Lokalisation der Fernmetastasen: keine

6.) Tumorvorbehandlung: explorative Laparotomie 1994, Gastroenterostomie

7.) Therapie mit Chemotherapie/Selen:

a) Chemotherapeutikum: 5-Fluoruracil, 750 mg, i.v., von X/94 bis VI/95,

Mitomycin, 10 mg, i.v., von X/94 bis VI/95

b) Selen: Selenase® 10 mg, i.v., von X/94 bis VI/95

c) Ansprechen der Therapie: Vollremission, Schmerzfreiheit, Gewichtszunahme

d) Dauer des Ansprechens: 9 Monate

e) Grund für Beendigung der Therapie: VI/95 Hirnmetastase

f) Verträglichkeit der Therapie: gut

8.) Vor- und Begleiterkrankungen: keine

9.) Begleittherapie während Chemo/Selen-Therapie: keine

10.) Überlebensstatus: Todesdatum 29.08.1995; tumorbedingt

#### Patient Nr. 5

1.) Diagnose: Pankreaskarzinom und Magenkarzinom

2.) Diagnose gestellt (Monat/Jahr): November 1997

3.) Histologie: Adenokarzinom, Grad III

4.) Tumorstadium zum Zeitpunkt des Therapiebeginns: T4, N1, M1



(T = Ausdehnung des Primärtumors

- N = Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen

M = Vorhandensein von Fernmetastasen)

5.) Lokalisation der Fernmetastasen: Leber, Lymphknoten

6.) Tumorvorbehandlung:

a) Operation: Probelaaparotomie, Gastroenterostomie 1997

b) Chemotherapie: Gemza von XI/97 bis I/98, Hochdosis-5-Fluoruracil und Leukovorine von I/98 bis III/98, Oxaliplatin von III/98 bis IV/98

7.) Therapie mit Chemotherapie/Selen:

a) Chemotherapeutikum: Gemzar, 1,2 mg, i.v., von IV/98 bis V/98

Mitomycin, 10 mg, i.v. von IV/98 bis V/98

b) Selen: Selenase®, 30 mg, i.v., von IV/98 bis V/98

c) Ansprechen der Therapie: Teilremission, erhebliche Schmerzreduktion

d) Dauer des Ansprechens: 1 Monat

e) Grund für Beendigung der Therapie: Tod

f) Verträglichkeit der Therapie: ausgeprägte Stomatitis

8.) Vor- und Begleiterkrankungen: keine

9.) Begleittherapie während Chemo/Selen-Therapie: keine

10.) Überlebensstatus: tot

Todesdatum: 13.05.1998;

Todesursache: Panzytopenie

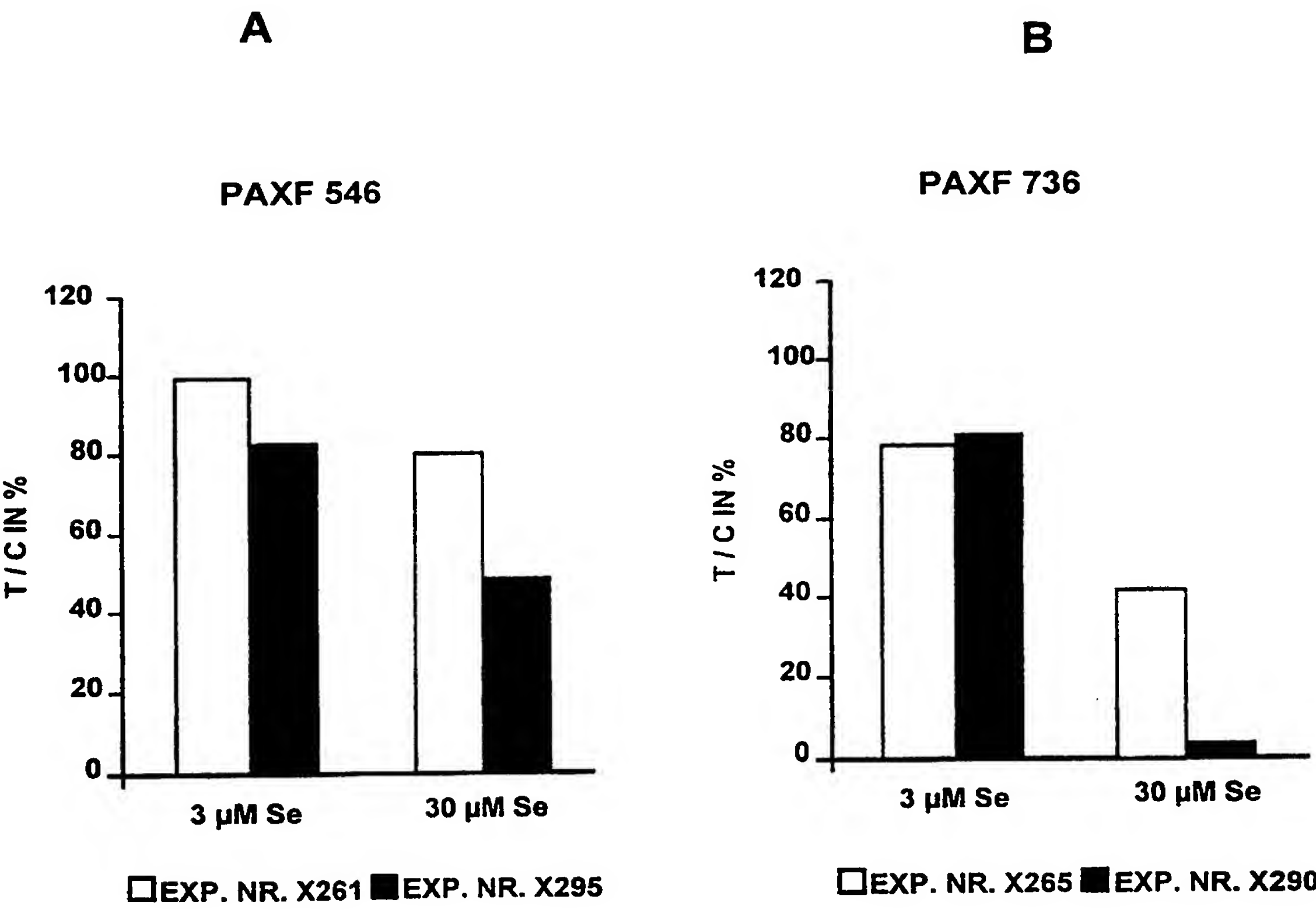
**Patentansprüche**

1. Verwendung von Selen und/oder mindestens einer Selenverbindung zur Wirkungssteigerung eines Zytostatikums oder einer Mischung von Zytostatika.
2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Selenverbindung eine organische Selenverbindung ist.
3. Verwendung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die organische Selenverbindung Selenomethionin ist.
4. Verwendung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die organische Selenverbindung Selenocystein ist.
5. Verwendung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die organische Selenverbindung Phenylenbis(methylen)selenocyanat ist.
6. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Selenverbindung ein Selenoxid ist.
7. Verwendung nach Anspruch 1 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Selenverbindung ein Salz von  $\text{SeO}_2$  ist.
8. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Zytostatikum ein Mitose-hemmendes Zytostatikum ist.
9. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Zytostatikum ein Nukleinsäuresynthese-hemmendes Zytostatikum ist.
10. Verwendung nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Nukleinsäuresynthese-hemmende Zytostatikum Gemcitabin ist.

11. Verwendung nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Nukleinsäuresynthese-hemmende Zytostatikum Mitomycin C ist.
12. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß Selen und/oder die Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 1,25 mg/kg Körpergewicht, und das Zytostatikum in einer Konzentration von 2 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche bis 240 g/m<sup>2</sup> Körperoberfläche verwendet wird.
13. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß Selen und/oder die Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 0,3 mg/kg Körpergewicht, und das Zytostatikum in einer Konzentration von 20 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche bis 1000 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche verwendet wird.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 in der zytostatischen Therapie.
15. Kit, umfassend Selen und/oder mindestens eine Selenverbindung und ein Zytostatikum oder eine Mischung von Zytostatika als Kombinationspräparat zur gleichzeitigen, getrennten oder zeitlich abgestuften Anwendung in der zytostatischen Therapie.
16. Kit nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Selenverbindung eine organische Selenverbindung ist.
17. Kit nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß die organische Selenverbindung Selenomethionin ist.
18. Kit nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß die organische Selenverbindung Selenocystein ist.

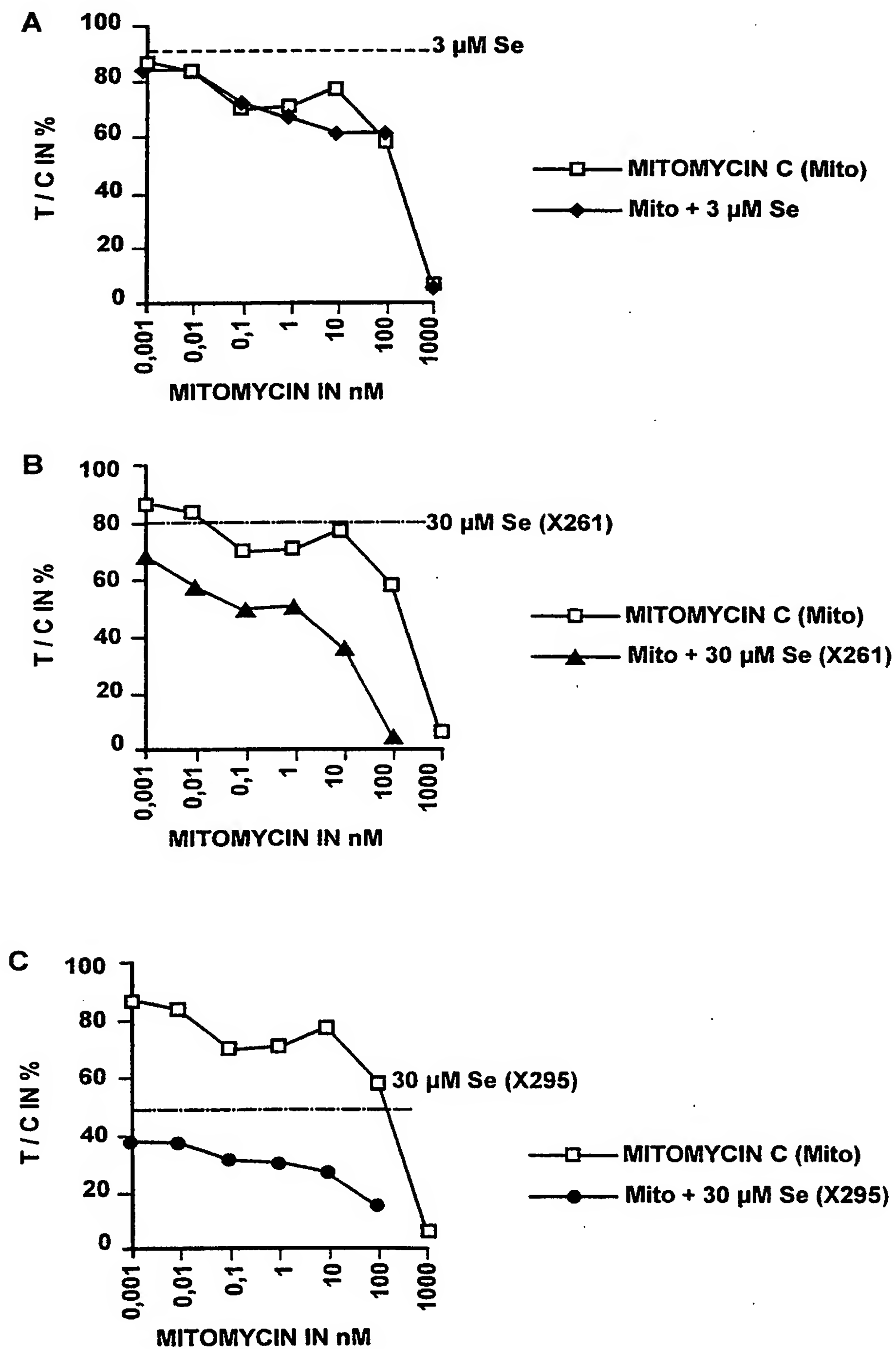
19. Kit nach Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß die organische Selenverbindung Phenylenbis(methylen)selenocyanat ist.
20. Kit nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Selenverbindung ein Selenoxid ist.
21. Kit nach Anspruch 15 oder 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Selenverbindung ein Salz von  $\text{SeO}_2$  ist.
22. Kit nach mindestens einem der Ansprüche 15 bis 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Zytostatikum ein Mitose-hemmendes Zytostatikum ist.
23. Kit nach mindestens einem der Ansprüche 15 bis 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Zytostatikum ein Nukleinsäuresynthese-hemmendes Zytostatikum ist.
24. Kit nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Nukleinsäuresynthese-hemmende Zytostatikum Gemcitabin ist.
25. Kit nach Anspruch 23, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Nukleinsäuresynthese-hemmende Zytostatikum Mitomycin C ist.
26. Kit nach mindestens einem der Ansprüche 15 bis 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß Selen und/oder die Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 1,25 mg/kg Körpergewicht, und das Zytostatikum in einer Konzentration von 2 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche bis 240 g/m<sup>2</sup> Körperoberfläche verwendet wird.
27. Kit nach mindestens einem der Ansprüche 15 bis 25, **dadurch gekennzeichnet**, daß Selen und/oder die Selenverbindung in einer Konzentration von 0,1 mg/kg Körpergewicht bis 0,3 mg/kg Körpergewicht, und das Zytostatikum in einer Konzentration von 20 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche bis 1000 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche verwendet wird.

Fig. 1



2/5

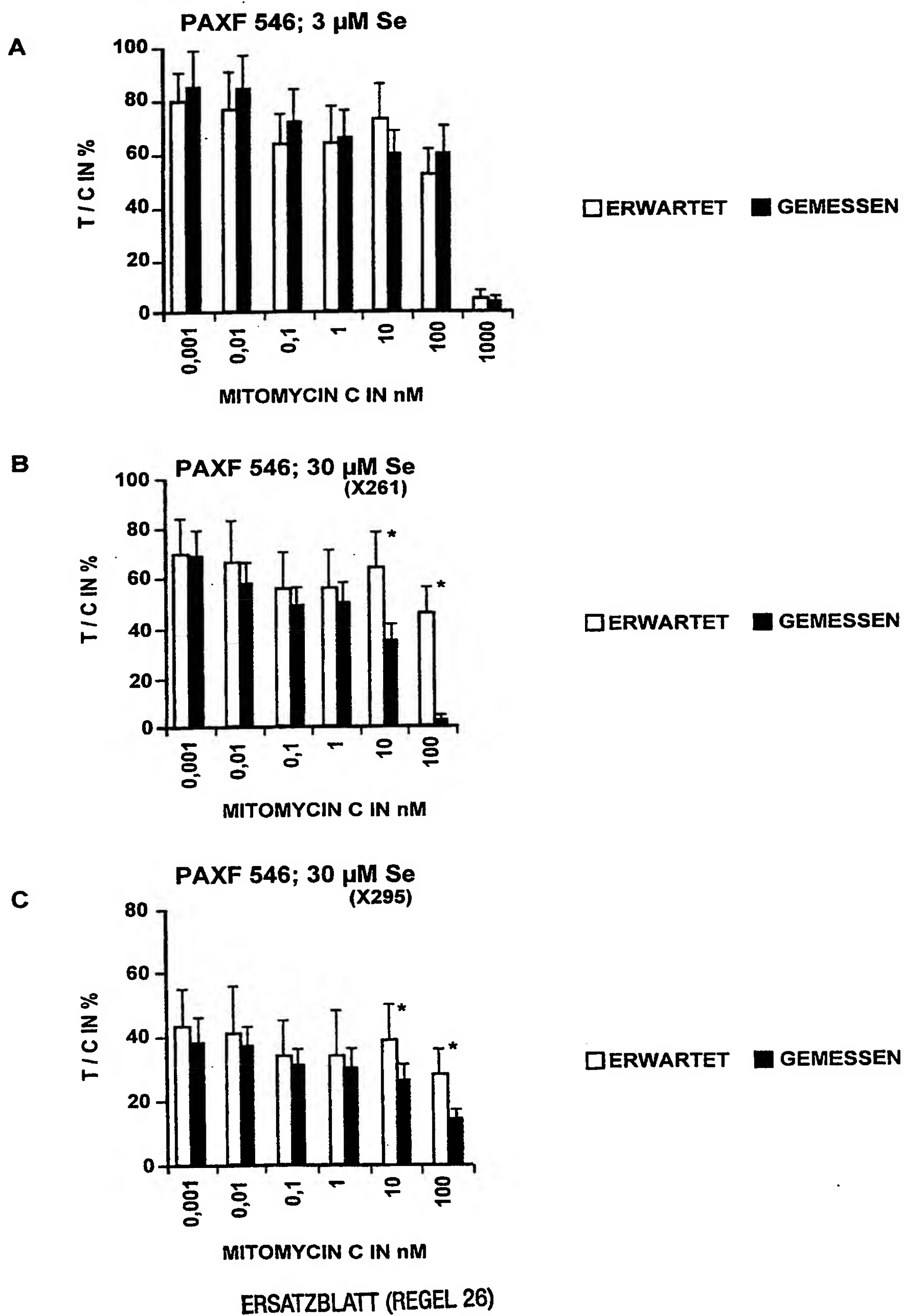
Fig. 2





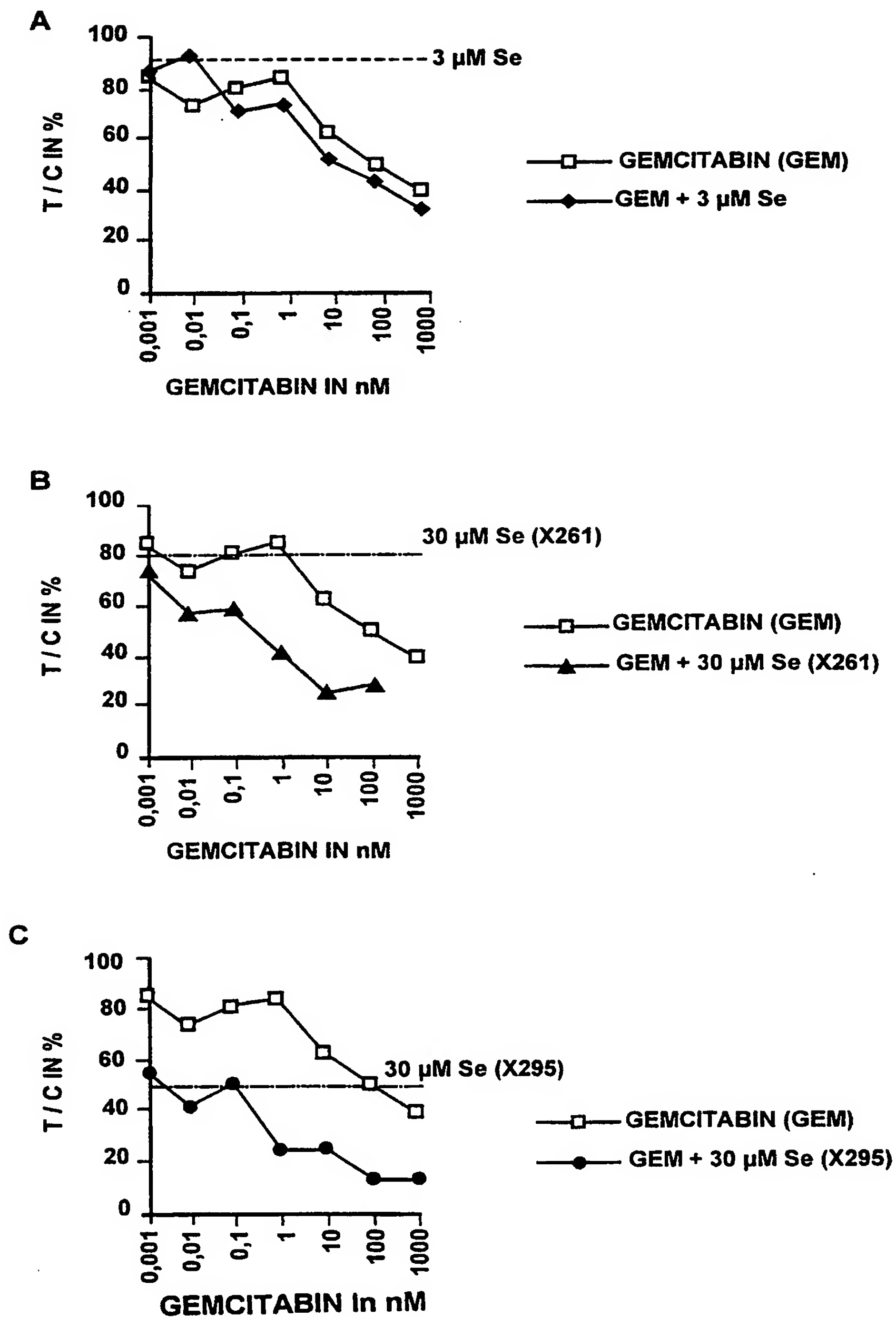
3/5

Fig. 3

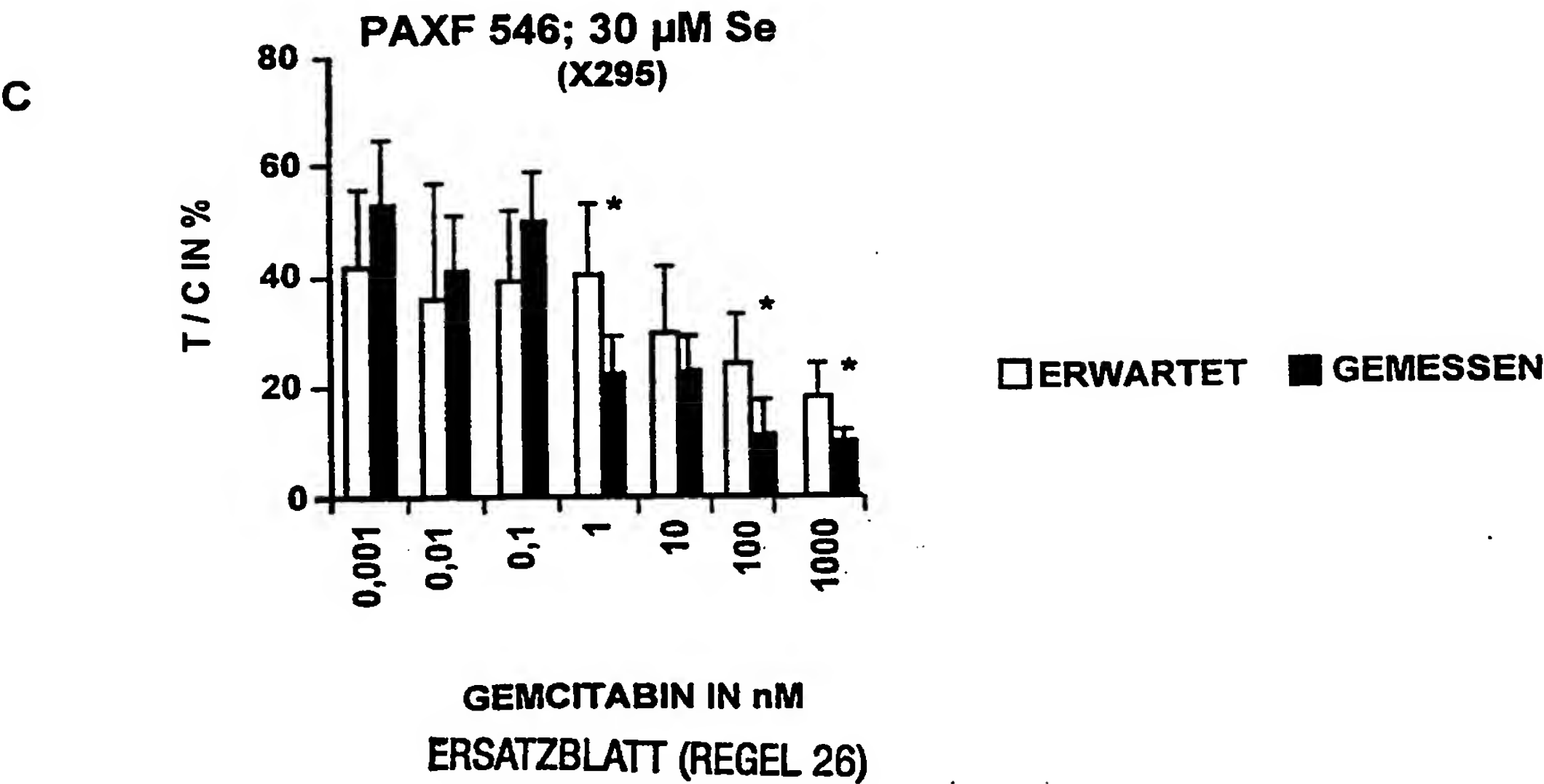
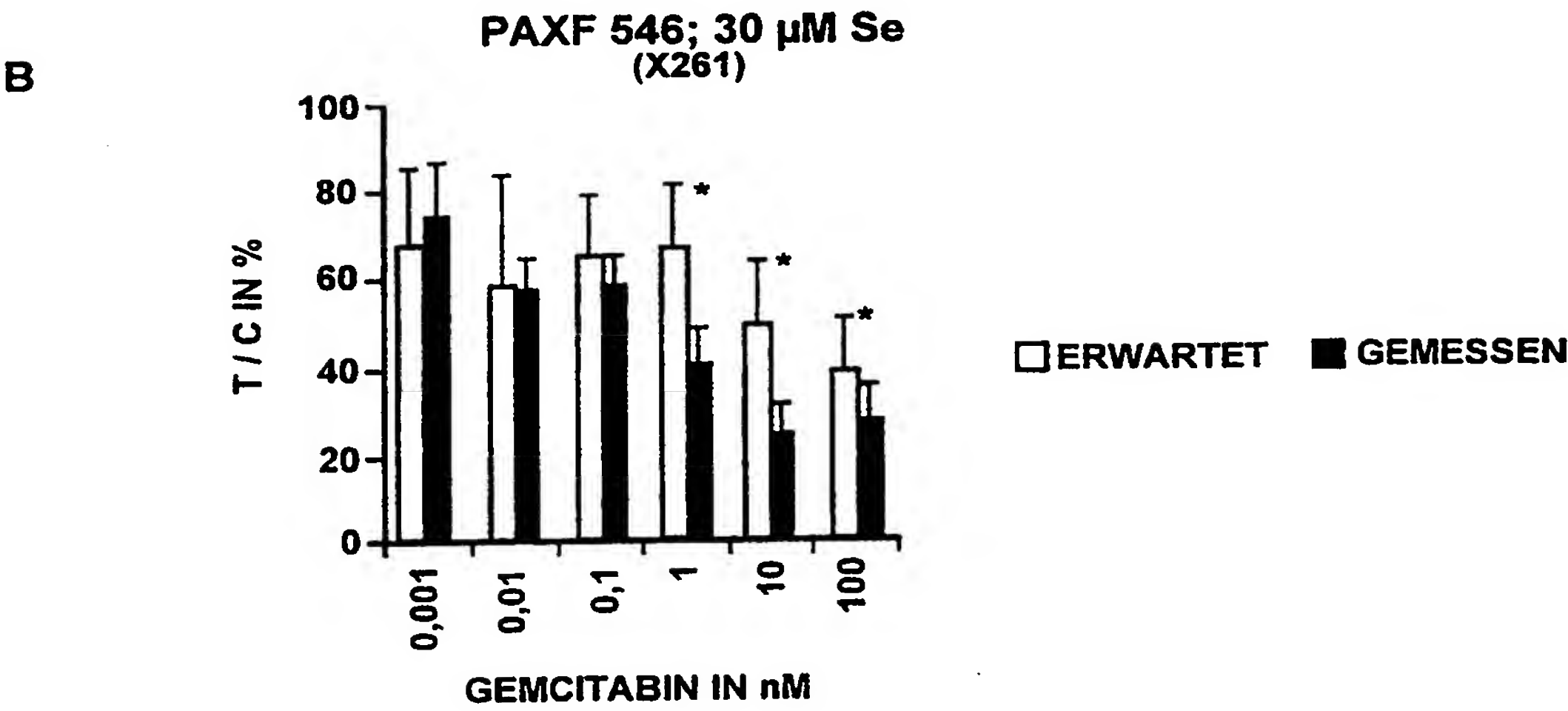
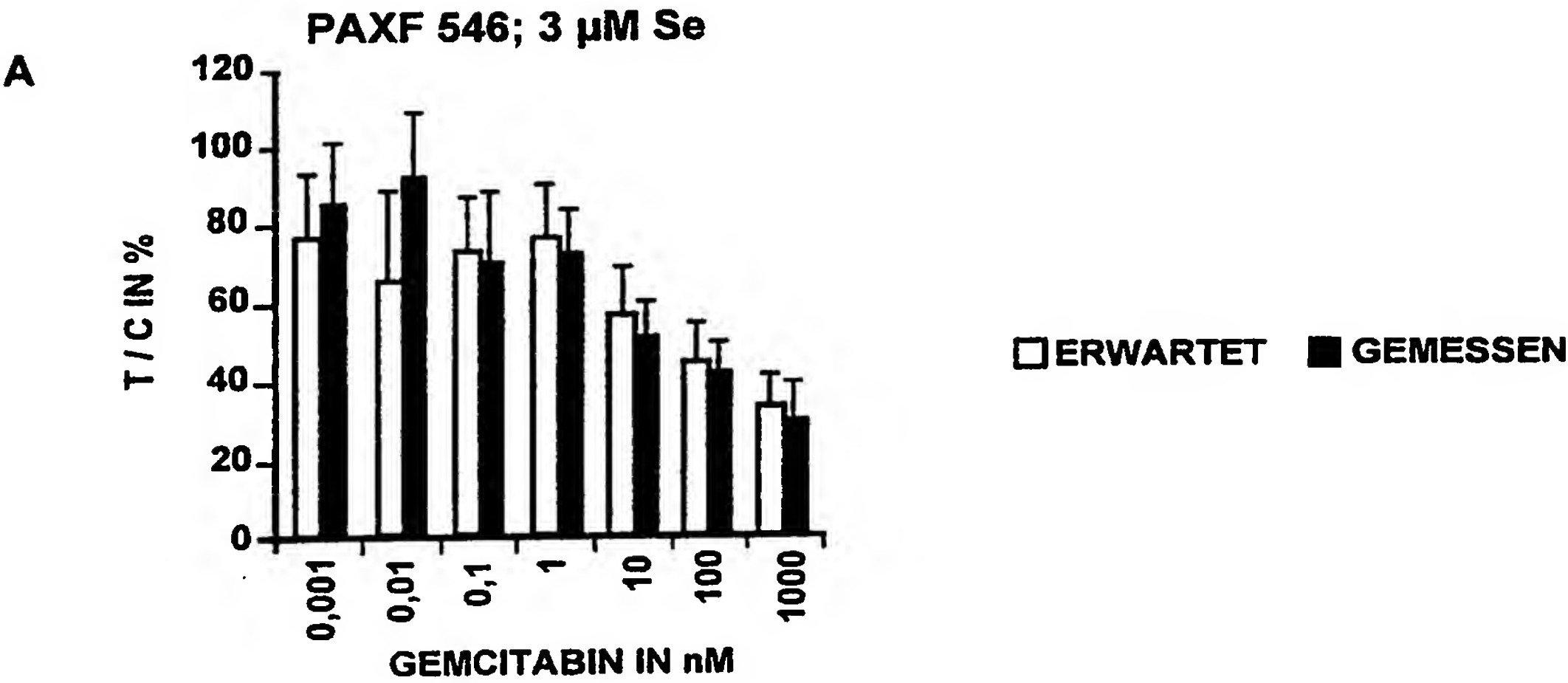


4/5

Fig. 4



5/5  
Fig. 5



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/03771

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K33/04 A61K31/495 A61K31/40 //(A61K33/04,31:40),  
(A61K33/04,31:495)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | DE 40 24 885 A (NATTERMANN A & CIE)<br>13 February 1992 (1992-02-13)   | 1-27                  |
| Y          | abstract   | 1-27                  |
| X          | KRAMER K.: "Antioxidants in oncology!.<br>ANTIOXIDANZIEN IN DER ONKOLOGIE."<br>DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FUR ONKOLOGIE, (1994)<br>26/3 (76-83). , XP002116032<br>abstract                               | 1-27                  |
| X          | GUSTAFSON D L ET AL: "Inhibition of<br>mitomycin C's aerobic toxicity by the<br>seleno-organic antioxidant PZ-51."<br>CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY,<br>(1991) 28 (3) 228-30. , XP002116033 | 15-27                 |
| Y          | abstract   | 1-27                  |
|            | ---<br>-/--  |                       |



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 September 1999

Date of mailing of the international search report

27/10/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Herrera, S

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/03771

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | STRAMA H. ET AL: "An interesting case from oncological practice!. DER INTERESSANTE FALL."<br>ZEITSCHRIFT FUR ONKOLOGIE, (1997) 29/1 (24-25). , XP002116034<br>the whole document<br>---   | 1-27                  |
| Y          | KIREMIDJIAN-SCHUMACHER L. ET AL:<br>"Regulation of cellular immune responses by selenium."<br>BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH, (1992) 33/1 (23-35). , XP002116035<br>abstract<br>---  | 1-27                  |
| Y          | DOROSHOW J H ET AL: "Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones."<br>PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, (1990) 47 (3) 359-70. REF: 146 , XP002116036<br>See page 366, summary<br>--- | 1-27                  |
| Y          | EP 0 750 911 A (LIFE SCIENCE LABS INC)<br>2 January 1997 (1997-01-02)<br>claims 1,13<br>-----   | 1-27                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PLT/EP 99/03771

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| DE 4024885 A                              | 13-02-1992          | AT 171621 T                | 15-10-1998          |
|   |                     | CA 2088760 A               | 01-02-1993          |
|   |                     | DE 69130292 D              | 05-11-1998          |
|   |                     | DE 69130292 T              | 08-04-1999          |
|   |                     | WO 9202221 A               | 20-02-1992          |
|   |                     | EP 0542807 A               | 26-05-1993          |
|   |                     | ES 2123510 T               | 16-01-1999          |
|   |                     | JP 5509309 T               | 22-12-1993          |
|   |                     | US 5385726 A               | 31-01-1995          |
| <hr/>                                     |                     |                            |                     |
| EP 0750911 A                              | 02-01-1997          | NONE                       |                     |
| <hr/>                                     |                     |                            |                     |



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PC 1/EP 99/03771

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K33/04 A61K31/495 A61K31/40 //(A61K33/04,31:40),  
(A61K33/04,31:495)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | DE 40 24 885 A (NATTERMANN A & CIE)<br>13. Februar 1992 (1992-02-13)   | 1-27               |
| Y          | Zusammenfassung  | 1-27               |
| X          | KRAMER K.: "Antioxidants in oncology!<br>ANTIOXIDANZIEN IN DER ONKOLOGIE."<br>DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FÜR ONKOLOGIE, (1994)<br>26/3 (76-83). , XP002116032<br>Zusammenfassung                         | 1-27               |
| X          | GUSTAFSON D L ET AL: "Inhibition of<br>mitomycin C's aerobic toxicity by the<br>seleno-organic antioxidant PZ-51."<br>CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY,<br>(1991) 28 (3) 228-30. , XP002116033 | 15-27              |
| Y          | Zusammenfassung  | 1-27               |
|            | ---  |                    |
|            | ---/---  |                    |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. September 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/10/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrera, S

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03771

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| DE 4024885 A                                       | 13-02-1992                    | AT 171621 T                       | 15-10-1998                    |
|  |                               | CA 2088760 A                      | 01-02-1993                    |
|  |                               | DE 69130292 D                     | 05-11-1998                    |
|  |                               | DE 69130292 T                     | 08-04-1999                    |
|  |                               | WO 9202221 A                      | 20-02-1992                    |
|  |                               | EP 0542807 A                      | 26-05-1993                    |
|  |                               | ES 2123510 T                      | 16-01-1999                    |
|  |                               | JP 5509309 T                      | 22-12-1993                    |
|  |                               | US 5385726 A                      | 31-01-1995                    |
| EP 0750911 A                                       | 02-01-1997                    | KEINE                             |                               |

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN |   |                    |
|--|---|--------------------|
| Kategorie*   | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
| X  | STRAMA H. ET AL: "An interesting case from oncological practice!. DER INTERESSANTE FALL."<br>ZEITSCHRIFT FUR ONKOLOGIE, (1997) 29/1 (24-25). , XP002116034<br>das ganze Dokument<br>---   | 1-27               |
| Y  | KIREMIDJIAN-SCHUMACHER L. ET AL:<br>"Regulation of cellular immune responses by selenium."<br>BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH, (1992) 33/1 (23-35). , XP002116035<br>Zusammenfassung<br>---   | 1-27               |
| Y  | DOROSHOW J H ET AL: "Role of the glutathione-glutathione peroxidase cycle in the cytotoxicity of the anticancer quinones."<br>PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, (1990) 47 (3) 359-70. REF: 146 , XP002116036<br>See page 366, summary<br>--- | 1-27               |
| Y  | EP 0 750 911 A (LIFE SCIENCE LABS INC)<br>2. Januar 1997 (1997-01-02)<br>Ansprüche 1,13<br>-----  | 1-27               |